TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBON NANOLİFLERE YÜKLENMİŞ DOKSORUBİSİN /VİTAMİN D / RUTİN KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

MERVE GÜRBOĞA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. ÖZLEM BİNGÖL ÖZAKPINAR

İKİNCİ DANIŞMAN

DOÇ.DR. ELİF ÇALIŞKAN SALİHİ

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve GÜRBOĞA

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri bilgi ve deneyimleri ile gelişimimi sağlayan, her aşamada bana karşı olan güvenlerini ve desteklerini hissettiğim değerli tez danışmanlarım Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR ve Doç. Dr. Elif ÇALIŞKAN SALİHİ'ye katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Derslerini almış olma şansına eriştiğim için mutluluk duyduğum, keyifle öğreten ve öğrencilerine her zaman ilgiyle yaklaşan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Derya ÖZSAVCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçteki tüm sorularımı sabırla yanıtlayan, laboratuvarda karşılaştığım problemlerin üstesinden gelmemde daima yardımcı olan değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Turgut ŞEKERLER'e teşekkür ederim.

Örneklerimin karakterizasyonu aşamasındaki katkılarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Necla KULABAŞ ve Sayın Öğr. Gör. Fatih Serdar SAYIN' a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman destekçim olan kıymetli arkadaşım Havva Daştan'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Elif KAYA ve Sena ASLAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca yanımda olan sevgili arkadaşım Zeki'ye teşekkür ederim.

İdeallerim doğrultusunda yürüyebilmem için beni her zaman destekleyen ve cesaretlendiren canım anneme, babama ve abime bana kazandırdıkları her şey için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I. **TEŞEKKÜR**……**ii**

II. **İÇİNDEKİLER**……**iii**

III. KISALTMALAR ve SİMGELER……..**vı**

IV. ŞEKİL LİSTESİ……...**ix**

V. TABLO LİSTESİ……..**x**

VI. RESİM LİSTESİ……..**xi**

1. ÖZET……...**1**

2. SUMMARY……**2**

3. GİRİŞ ve AMAÇ……**3**

4. GENEL BİLGİLER……**7**

4.1. Kanser.....7

4.1.1. Meme kanseri.....8

4.2. Polifenoller.....10

4.2.1. Rutin ve farmakolojik özellikleri.....10

4.3. Doksorubisin.....12

4.3.1. Doksorubisin etki mekanizması.....13

4.3.2. Doksorubisin yan etkileri.....13

4.4. Vitamin D Kaynakları ve Biyosentezi.....14

4.4.1. Vitamin D metabolizması.....15

4.4.2. Vitamin D yetersizliği.....16

4.5. Nanomalzemeler.....17

4.5.1. Karbon bazlı nanomalzemeler.....19

4.5.2. Karbon nanolifler.....19

4.6. Aerojel.....21

4.6.1. Aerojellerin sınıflandırılması ve üretimi.....21

4.6.2. Aerojeller ve Biyomedikal Uygulamalar 23

5. GEREÇ ve YÖNTEM.....25
5.1. Gereçler.....25
5.1.1. Hücre kültürü ekipmanları.....25
5.1.2. Laboratuvar gereçleri.....25
5.1.3. Kimyasallar.....26
5.2. Yöntem.....27
5.2.1. Karbon nanoliflerin aktifleştirilmesi.....27
5.2.2. Rutin ile modifiye edilmiş ACNF'e VD ve DOX yüklenmesi.....27
5.2.3. Aerojellerin hazırlanması.....28
5.2.4. Aerojel ve ACNF-Rutin karakterizasyonu.....29
5.2.5. Hücre kültürü.....30
5.2.5.1. Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif aktivitesinin belirlenmesi.....30
5.2.5.2. Hücre migrasyonu üzerindeki etkinin belirlenmesi.....33
5.2.5.3. Apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının belirlenmesi.....34

6. BULGULAR……..37

6.1. Hazırlanan Rutin ile Modifiye Edilmiş ACNF'in Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....37
6.2. Rutin ile Modifiye Edilmiş ACNF İçerikli Aerojel Matrikslerin Sağlıklı Hücreler ve Meme Kanseri Hücrelerinin Canlılığına Etkisi.....39
6.3. Rutin ile Modifiye Edilmiş ACNF ile VD ve DOX İçeren Kompozit Aerojellerin Hücre Proliferayonuna Etkisi.....40
6.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile Kompozit Aerojel Sistemin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi.....44
6.5. Kompozit Aerojel Taşıyıcı Sistemin MCF-7 Hücre Migrasyonuna Etkisinin İncelenmesi.....46
6.6. Hücre Ölüm Mekanizmalarının Biyokimyasal ve Morfolojik Olarak İncelenmesi.....47

6.6.1. Kaspaz 3-8-9 enzim aktivasyonu ile apoptozun saptanması.....48
6.6.2. Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi.....49
6.6.3. Akridin Oranj ve Etidyum Bromür boyaları ile apoptozun saptanması.....50
6.7. Rutin ile Modifiye Edilmiş ACNF ve Hazırlanan Karbon Bazlı Kompozit Aerojel Taşıyıcı Sistemin Karakterizasyonu.....52

7. TARTIŞMA ve SONUÇ……55
8. KAYNAKLAR……..…59

KISALTMALAR ve SİMGELER

µL: mikrolitre

µm: mikrometre

µM: mikromolar

µg/ml: mikrogram/mililitre

1,25(OH)$_2$D: 1,25-dihydroxyvitamin D

25(OH)D: 25-hidroksivitamin D

3D: 3 boyutlu

7-DHK: 7-dehidrokolesterol

ABC: ATP bağlayıcı kaset proteinleri

ACNF: aktive edilmiş karbon nanolif

ATP: Adenozin trifosfat

Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2 protein ailesi

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

BRCA: Meme kanseri duyarlılık geni

CAMP : Siklik adenozin monofosfat

CK5/6: Sitokreatin 5/6

CNF: Karbon nanolif

CNT: Karbon nanotüp

COX-2: Siklooksijenaz-2

CYP P450: Sitokrom P 450

CYP2R1: 25-hidroksilaz

CYP27B: 1α-hidroksilaz

dB: Desibel

DBP: Vitamin D bağlayıcı protein

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

DOX: Doksorubisin

EGFR: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü

ER: Östrojen reseptörü

FBS: Fetal sığır serumu

HER-2: Tirozin kinaz reseptörü 2

IL-6: İnterlökin-6

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

i-NOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

m/s: metre/saniye

MAPK: Mitojenle aktive edilen protein kinaz

mTOR: Memeli rapamisin hedefi protein kinaz

MTT: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NF-KB: NF-kappa B transkripsiyon faktörü

nm: nanometre

NOS: Nitrik oksit sentaz

p53: Tümör protein 53

PBS: Fosfat buffer saline

PI3K/ Akt: Fosfoinozitid 3-Kinaz/ protein kinaz B

PR: Progesteron reseptörü

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

TEM: Taramalı elektron mikroskobu

TNF-α: Tümör nekroz faktör alfa

UVB: Ultraviole B

VD: Vitamin D

VDR: Vitamin D reseptörü

W/Mk: Isı iletkenlik katsayısı

α : Alfa

β: Beta

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Aerojellerin bileşimlerine göre sınıflara ayrılması.....22

Şekil 2. Sol-jel metodu ile aerojel üretimi.....23

Şekil 3. ACNF ve Rutin ile modifiye edilmiş AR'nin NIH3T3 hücre canlılığına etkisi.....37

Şekil 4. ACNF ve Rutin ile modifiye edilmiş ACNF'in meme kanseri proliferayonuna etkisi.....38

Şekil 5. Rutin ile modifiye edilmiş ACNF içeren aerojel kompozitlerin hücre proliferasyonuna etkisi.....39

Şekil 6. Hazırlanan karbon bazlı nanosistemlerin MCF-7 proliferasyonuna etkisi.....40

Şekil 7. Hazırlanan karbon bazlı nanosistemlerin MDA-MB-231 proliferasyonuna etkisi.....41

Şekil 8. Hazırlanan karbon bazlı nanosistemin NIH3T3 hücre canlılığına etkisi.....42

Şekil 9. Dox uygulanan MCF-7 ve NIH3T3 hücrelerinin canlılık oranları.....43

Şekil 10. Aero (AR+VD+DOX)'un uygulanan MCF7 hücrelerinde zamana bağlı olarak hücre indeksi.....44

Şekil 11. Aero (AR+VD+DOX)'un uygulanan NIH3T3 hücrelerinde zamana bağlı olarak hücre indeksi.....45

Şekil 12. Hazırlanan aerojel kompozit ilaç taşıyıcı sistemin MCF-7 hücrelerini apoptotik olarak uyarması.....48

Şekil 13. Aero (AR+VD+DOX) eklenen MCF-7 hücrelerinde membran potansiyeli değişimi.....49

Şekil 14. Rutin İle modifiye edilmiş karbon nanolif ve aerojel kompozit taşıyıcı sistemin FTIR spektrumu.....52

Şekil 15. Rutin İle modifiye edilmiş karbon nanolif ve aerojel kompozit taşıyıcı sistemin XRD analizi.....53

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanserinin moleküler altgrupları ve genel özellikleri.....9

Tablo 2. Yapı boyutuna göre nanomalzemelerin sınıflandırılması.....18

Tablo 3. Aero (AR+VD+DOX) uygulanan MCF-7 hücrelerinde % yara kapanması.....47

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Quercetin 3-O-rutinoside ($C_{27}H_{30}O_{16}$) kimyasal yapısı.....11

Resim 2. Doksorubisin ($C_{27}H_{29}NO_{11}$) kimyasal gösterimi.....12

Resim 3a. Ergokalsiferol ($C_{28}H_{44}O$) kimyasal gösterimi.....15

Resim 3b. Kolekalsiferol ($C_{27}H_{44}O$) kimyasal gösterimi.....15

Resim 4. Grafit karbon allotroplarının morfolojisi.....20

Resim 5. Aero (AR+VD+DOX) eklenen MCF7 hücrelerinin 48 saatteki yara kapanma değerlendirmesi.....46

Resim 6. Aero (AR+VD+DOX) kompozit taşıyıcının MCF7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin akridin oranj-etidyum bromür boyaları ile gösterilmesi.....51

Resim 7. Rutin ile modifiye edilmiş ACNF ve Aero (AR+VD+DOX)'un SEM görüntüleri.....54

1.ÖZET

Karbon Nanoliflere Yüklenmiş Doksorubisin/Vitamin D/Rutin Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif ve Apoptotik Etkilerinin in vitro Araştırılması

Öğrenci Adı : Merve GÜRBOĞA

Danışman Adı : Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

İkinci Danışman Adı : Doç. Dr. Elif ÇALIŞKAN SALİHİ

Programın Adı : Biyokimya Tezli Yüksek Lisans (Eczacılık Fakültesi)

Amaç : Bu çalışmada, fizikokimyasal özellikleri ve fonksiyonelleştirilebilir olmaları ile kanser tedavisi açısından umut vadeden karbon nanolifler, antioksidanlarca zengin ve kemoterapinin olumsuz etkilerini azalttığı bilinen rutin polifenolik bileşiği ile modifiye edilmiştir. Rutin ile modifiye edilmiş karbon nanolifler, doksorubisin gibi klinikte sıklıkla kullanılan bir kanser ilacı ve kanser hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz gibi önemli süreçlerde rol aldığı gösterilen vitamin D ile kombine edilmiştir. Yüksek biyouyumluluk ve çevreci bir yaklaşım sunan aerojel matrisler kullanılarak geliştirdiğimiz karbon bazlı nanosistem ile meme kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve yöntem: Hazırlanan karbon bazlı nanosistemlerin meme kanseri hücre hatları üzerindeki antiproliferatif ektisi MTT yöntemi ve gerçek zamanlı hücre ölçer cihazı kullanılarak tespit edildi. Hazırlanan aerojel taşıyıcıların hücre migrasyonuna etkisi yara iyileşmesi deneyi ile incelendi. Olası apoptotik mekanizmaların belirlenmesi morfolojik görüntülemeler ve biyokimyasal yöntemler ile gerçekleştirildi.

Bulgular: Aktif karbon nanoliflerin rutin ile modifiye edilmesinin ardından doksorubisin ve VitaminD ile yüklenmesi sonucu oluşturulmuş kompozit aerojel taşıyıcının, doksorubisinin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini azaltırken meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç: Geliştirilen karbon bazlı nanosistem, meme kanseri hücreleri üzerinde etkili olmakla beraber ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmak üzere umut vadetmektedir.

Anahtar kelimeler: Karbon nanolif, meme kanseri, Vitamin D, rutin, Doksorubisin

2. SUMMARY

In vitro Research on Carbon Nanofibers with Doxorubicin/ Vitamin D/ Rutin Combination loads and Their Antiproliferative and Apoptotic Effects on Breast Cancer Cells

Student Name : Merve GURBOGA

Name of Supervisor: Assoc. Prof. Özlem BINGOL OZAKPINAR

Name of Supervisor : Assoc. Prof. Elif CALISKAN SALIHI

Program Name : Biochemistry MSc Program (Faculty of Pharmacy)

Objective : In this study, carbon nanofibers (CNFs), which have high chemical resistance abilities, body distribution properties, and functionalizable, are modified with a rutin compound that is rich in antioxidant properties. The CNFs modified with rutin were combined with doxorubicin (DOX), a cancer drug commonly used in clinics, and vitamin D (VD), which has been shown to play a role in important processes such as proliferation and apoptosis in cancer cells. Our aim in this study, the antiproliferative and apoptotic effects of the carbon-based nanosystem developed with biocompatible and environmentally friendly aerogel matrixes on breast cancer cells.

Material and methods: The antiproliferative effect of the carbon-based nanosystems on breast cancer cell lines was determined using the MTT and a real-time cell analysis. The effect of aerogel carriers on cell migration was studied with wound healing assay. Possible apoptotic mechanisms were determined utilizing morphological imaging and biochemical methods.

Results: It was determined that the composite aerogel carrier prepared by modifying active carbon nanofibers with rutin and loading them with DOX and VD reduces the cytotoxic effect of DOX on healthy cells while showing antiproliferative and apoptotic effects on breast cancer cells.

Conclusion : The carbon-based nanosystem shows promising results for use as a drug delivery system, as it is effective on breast cancer cells.

Keywords : Carbon nanofiber, breast cancer, vitamin D, Rutin, Doxorubicin

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyadaki ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırayı alan kanser, hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını etkileyen çok sayıda mutasyon sonucu oluşan ölümcül bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 2020 yılında yaklaşık 10 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir (www.who.int/health-topics/cancer , erişim tarihi: 10 Eylül 2022). Bilim dünyasındaki önemli gelişmelere rağmen kullanılan ilaçların büyük çoğunluğunun seçicilik göstermemesi, yan etkilerinin çok fazla olması, hastaların yaşam standardını olumsuz etkilemesi gibi nedenlerle kanser global bir sorun olmaya devam etmektedir.

Kanser ve birçok hastalıkta ana problem, ilaç moleküllerinin vücut içerisinde doğru doku ve hücrelere etkili bir şekilde ulaşamamasından kaynaklanmaktadır. Başarılı bir ilaç taşıma sistemi, ilacın vücut içerisinde korunarak etkili dozunda taşınmasını, doğru hedef noktaya ulaşmasını ve belirlenen hız ile sürede salınımını yapmasını amaçlamaktadır ("Modification of drug release", 2015). Biyolojik açıdan uyumlu, düşük maliyetli, kararlı bir yapıya sahip, kontrollü salınım yapabilen ve kolay uygulanabilen ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik ilgi her geçen gün artmakta ve kanser tedavisi için potansiyel taşımaktadır.

Nanopartiküller, nanoölçekli (10^{-9}m) boyutlara sahip, fizikokimyasal, termal ve mekanik özellikleri bakımından dikkat çeken malzemelerdir. Nanomalzemelerin geniş bir yüzey alanına ve stabil bir yapıya sahip olması gibi özellikleri kanser tedavisine yönelik çalışmaların önünü açmaktadır. Karbon bazlı nanomalzemelerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanıldığı çalışmalar ile yüksek dağılım özelliklerine ve biyouyumluğa sahip oldukları bilinmektedir (Debnath ve Srivastava, 2021). Karbon nanolifler, grafen katmanların konik biçimde üst üste yığılması ile meydana gelen nano yapılardır (Feng ve ark., 2014). Boyutları 10 μm'ye, çap ölçüleri 100 nm'ye varabilmektedir. Nanokoni katmanlar sayesinde fonksiyonelleştirilebilir bir yüzey ve geniş en-boy oranı ile yüksek yükleme kapasitesi sunmaktadır (Wang ve ark., 2019a). Karbon bazlı nanomalzemeler ile gerçekleştirilen kanser çalışmalarında, bu nanomalzemelerin birçok kanser türü için anti kanserojenik etki gösterdiği ve

gemsitabin (Pardo ve ark., 2018), paklitaksel (Guo ve ark., 2008), sisplatin (Cao ve ark., 2016) gibi kanser ilaçları ile fonksiyonelleştirilebildikleri gösterilmiştir.

Doksorubisin (DOX), antrasiklin türevi kanser ilacıdır. Kanser hücresinde nükleik asitlerin sentezini inhibe etmek ve serbest radikal üretimini uyararak DNA, protein ve membran yapılarına zarar vermesi şeklinde iki mekanizma üzerinden etki gösterir. Günümüzde meme, akciğer, mide, yumurtalık, tiroid başta olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Thorn ve ark., 2011a). Klinik kullanımında kısa ömürlü ve düşük terapötik indekse sahip olduğu bilinmektedir. Arzulanan terapötik etkiyi elde etmek için yüksek konsantrasyonlarda uygulanması gereklidir. Bu durum, normal dokularda şiddetli kardiyotoksisite ve bağışıklık sistemin baskılanmasına neden olur. Ek olarak, ilaç direnci oluşturması da kullanımını sınırlamaktadır. DOX kaynaklı kardiyotoksisite ve ilişkili morbidite riskini azaltmak için uygun bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesi büyük bir önem taşımaktadır (Shafei ve ark., 2017). Literatür taramaları göstermektedir ki DOX bazlı nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmalarda, meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser çeşidinde yan etkilerin azalması, ilaç sitotoksisitesinin artması ve çoğu durumda sitotoksik etki için gereken doz miktarının azaltılması sağlanmıştır. Literatürde, DOX için son yıllarda karbon veya diğer nanopartiküllerin taşıyıcı sistem olarak araştırılmaya ve üretilmeye başlandığına dair çalışmalara rastlanmış olsa da karbon nanolif içeren bir taşıyıcı sisteme rastlanılmamıştır (Liu ve ark., 2009; Hosnedlova ve ark., 2019).

Kemoterapötik ilaçlarda yaşanan toksisite, direnç gelişimi, yüksek maliyetler ve hastaların yaşam koşullarını olumsuz etkilemesi gibi problemler araştırmacıları doğal kaynaklardan elde edilmiş daha etkili, seçici özellik gösteren ve ekonomik kaynakların araştırılmasına yöneltmektedir. Rutin (rutoside, quercetin-3-O-rutinoside), bitkisel kökenli polifenolik flavonoidlerden birisidir. Serbest radikalleri bağlama kabiliyeti nedeniyle çok iyi bir antioksidan olarak kabul edilen rutin, DNA'yı çeşitli oksidatif hasar türlerinden korumada önemli bir rol oynar. Reaktif oksijen türleri (ROS), onkolojik hastalıkların gelişmesine katkıda bulunan önemli faktörlerden olduğundan dolayı, rutin potansiyel doğal kökenli ilaç adaylarından biri olarak düşünülmektedir (Koval'skii ve ark., 2014).

Güncel araştırmalar rutinin kanser tedavisi için farmakolojik faydalarını ortaya koymaktadır (Gullón ve ark., 2017). Kolorektal hücre hatlarında proliferasyon, anjiyogenez ve metastazın inhibisyonu ile birlikte hücre döngüsü durması, apoptoz yoluyla kanser hücresi büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Ganeshpurkar ve Saluja, 2017a). Ek olarak, polifenollerin kemokoruyucu olarak rol aldığı bilinmektedir (Khan ve ark., 2009). Rutin kullanımındaki başlıca dezavantaj, düşük çözünürlüğü sebebiyle zayıf biyoyararlanımıdır. Bu noktada rutinin çözünürlüğü, biyoyararlanımı, güvenli ve bölgeye özel hedefli dağıtımını artırmak için, nanoformülasyonlar veya ilaç verme sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Vitamin D (VD), yağda çözülebilen, 27 karbonlu bir prohormondur. Vücudun kalsiyum ve fosfat hemeostasını sağlamak başta olmak üzere birçok biyolojik süreçte görev alır. Vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3 (kolekalsiferol) olmak üzere iki farklı formda bulunur. Vitamin D_2 doğal olarak bazı bitki ve mantarlar tarafından üretilirken vitamin D_3, derinin ultraviyole ışınlarına maruz kalması sonucu doğal olarak vücut tarafından sentezlenir (Holick ve Chen, 2008a). Derideki melanin oranı, güneş ışığına maruz kalma süresi ve coğrafi konum vitamin D sentezini ve miktarını etkilemektedir. Birçok toplumda vitamin D yetersizliğine sıkça rastlanmaktadır. VD'nin yetersizliği antimitojenik, antiapoptotik ve prodiferansiyasyon sinyal yolaklarının bozulmasına yol açmaktadır (Feldman ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar VD eksikliği ile meme, kolon, rektal, gastrik ve over kanseri dahil olmak üzere en az 17 kanser türü arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Triple negatif meme kanseri hastalarında güçlü sitotoksik ve pro-apoptotik etkilere sahip olan cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)'nin düşük oranlarda sentezlendiği ve VD takviyesi ile bu peptidin ekspresyonunun uyarıldığı bildirilmiştir (García-Quiroz ve ark., 2016). Ek olarak, VD'nin çeşitli kemoterapi ajanlarının anti-tümor aktivitesini güçlendirdiğine dair önemli kanıtlar mevcuttur (Sundaram ve ark., 2000; Posner ve ark., 2001). Ancak, literatür verileri VD ve analoglarının yüksek dozlarda kullanıldığı durumlarda önemli bir anti-tümör aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (Giammanco ve ark., 2015). Yüksek doz VD kullanımı ise hiperkalsemiye sebep olmaktadır (Almouazen ve ark., 2013).

Bu noktada nanoformülasyonlar kullanılarak geliştirilecek sistemler, VD'nin emilimi ve biyoyararlanımı konusunda yaşanan sıkıntıların aşılmasını ve kanser tedavisinde kullanılmasının önünü açmaktadır.

Meme kanseri birçok alt türü olan, çevresel, genetik ve epigenetik risk faktörleri barındıran kompleks bir hastalık olmaya devam etmektedir. Sağkalım oranları seneler içerisinde artmış olsa da, etkili ve güvenilir ilaçlara ve formülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mevut ilaçlar hastaların yaşam standartını olumsuz etkilerken, sağlıklı dokular için de toksik etki göstermekte ve ilaçlara karşı direnç gelişmektedir. Kansere karşı etkili olabilecek doğal ürünler ise biyoyararlanım ve emilim noktasında zayıf kalmaktadır. Bu noktada sahip oldukları fizikokimyasal özellikleri ile nanomalzemeler kullanılarak geliştirilecek ilaç taşıma sistemleri avantaj sağlayabilir gözükmektedir. Bu tez çalışması ile rutin ile modifiye edilen karbon nanolif taşıyıcıların, DOX ve VD ile kombine edilmesi durumunda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerindeki olası antiproliferatif, apoptotik ve hücre göçü engelleyici etkilerinin ortaya çıkarılması ve sağlıklı dokular için biyouyumluluğu yüksek bir ilaç taşıyıcı sistemin oluşturulması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, vücudun çeşitli dokularındaki normal hücrelerin, büyüme kontrolünü kaybetmesi ve anormal olarak çoğalması ile karakterize edilen hastalığın genel adıdır (Cooper, 2000). İlk olarak M.Ö 1500 yıllarında Mısır papürüslerinde bahsedilen, Hipokrat tarafından ilk kez (M.Ö 460-370) ‘’karkinos’’ olarak isimlendirilen kanser, günümüz istatistiklerinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme sebep olan ikinci hastalık olarak yer almaktadır (Sudhakar, 2009; www.who.int/health-topics/cancer, Erişim tarihi: 16 Ekim 2022).

Kanserin başlaması ve ilerlemesi birçok çevresel ve genetik sürece bağlıdır. Mutasyonlar, DNA (deoksiribonükleik asit) hasarları gibi içsel faktörlerin yanı sıra enfeksiyon, beslenme, yaşam şekli gibi dışsal faktörler kaynaklı onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu ile hücre döngüsünün ilerleyişi bozulabilir ve apoptotik mekanizmalar devre dışı bırakılabilir (Sarkar ve ark., 2013). Önemli sinyal yolaklarında meydana gelen bu mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler sonucu normal hücrelerin kontrolsüz çoğalma, farklılaşma, bağışıklık sisteminden kaçabilme ve invazyon gibi özellikler kazanması ile hastalık gelişir (Hanson ve Tier, 1982; Odoux ve ark., 2008).

Kanserlerin isimlendirilmeleri, ilk olarak köken aldıkları doku veya organa göre yapılır. Vaskülarizasyon ve göç edebilme özellikleri sayesinde metastaz yapan hücreler, vücudun birçok dokusunda kötü huylu tümörler oluşturur. Bu tümörler, heterojen yapıdadır ve birçok farklı hücre tipi ile ekstraselüler matriks bileşenleri tarafından desteklenmektedir (Chévez-Barrios ve ark., 2007).

4.1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusunda meydana gelen fakat genetik ve epigenetik açıdan birçok alt tipe sahip olması ile uygulanan tedavilerden farklı klinik sonuçlar alınmasına sebep olan heterojenik bir kanser türüdür (Yersal ve Barutca, 2014). İlk olarak memenin glandular dokusundaki lobüllerde veya kanallardaki epitel hücrelerinde oluşmaktadır. Kanserli hücrelerin invazif özelliklerini zamanla artırmasıyla önce yakınlarındaki lenf nodüllerini, ardından vücuttaki diğer organları istila ederek yayılmaktadır (Feng ve ark., 2018).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre meme kanseri, akciğer kanserinden sonra kadınlar arasında en çok ölüme sebep olan ikinci kanser tipidir ve 2020 yılında 2.3 milyon kadına teşhis konulmuştur (www.who.int/health-topics/cancer, Erişim tarihi: 16 Ekim 2022). Meme kanseri için başlıca risk faktörü genetik yatkınlık ve aile öyküsüdür. BRCA1 ve BRCA2 en yaygın meme kanseri baskılayıcı genleri arasında yer alır ve bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanserin başlamasına sebep olabilmektedir (Kuchenbaecker ve ark., 2017). Alkol ve tütün kullanımı, aşırı radyasyona maruz kalma, düşük fiziksel aktivite, yaş, aşırı kilo, uzun süreli hormon kullanımı ve uzun süre emzirme meme kanseri riskini artırmaktadır (Hashemi ve ark., 2014).

Meme kanserinin sınıflandırması yapılırken tümör boyutu, lenf nodu tutulumu, histolojik yapı, hastanın yaşı gibi özelliklerin yanı sıra, immünohistokimayasal analizler ve gen ekspresyon profilleri oluşturularak alt gruplar belirlenmektedir (**Tablo 1**). Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), sitokeratinler (CK5/6) başta olmak üzere birçok proteinin hücrede ifade edilme seviyesi meme kanserinin alt tiplerini birbirinden ayırmak için kullanılmaktadır (Eroles ve ark., 2012; Dai ve ark., 2017; Fragomeni ve ark., 2018).

Tablo 1. Meme kanserinin moleküler alt grupları ve genel özellikleri

Altgrup	ER	PR	HER 2	CK5/6, EGFR	Sıklık	Prognoz
Luminal A [a]	+	ve/veya +	-	-	%50-60	İyi
Luminal B [b]	+	ve/veya +/-	-	-	%10-20	orta
Normal meme-benzeri	+	ve/veya +	-	+	%5-10	orta
HER 2-güçlendirilmiş	-	ve -	+	+/-	%10-15	kötü
Üçlü negatif veya bazal-benzeri	-	ve -	-	+	%10-20	kötü
Claudin-low	-	ve -	-	+/-	%12-14	kötü

[a] proliferasyon indeksi Ki67 <14% [b] Ki67 ≥14%

MCF-7, ilk olarak 1970 yılında metastatik meme kanseri hastası (adenokarsinoma) 69 yaşındaki bir kadının meme salgı kanallarından izole edilmiştir (www.atcc.org/products/htb-22, Erişim tarihi: 16 Ekim 2022). MCF-7, hormona duyarlı ilk meme kanseri hücre hattıdır. Epiteliyal özellikteki bu hücreler, yüksek miktarda östrojen reseptörü ifade etmektedir. Ayrıca progesteron ve glukokortikoid reseptörlerine de sahiptir (Camarillo ve ark., 2014). Moleküler olarak luminal A alt grubuna girmektedir. Zayıf invazif özellikleri sayesinde hastalığın gidişatı iyi seyretmektedir (Neve ve ark., 2006; Riaz ve ark., 2013). MCF7, hormon direnci çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

MDA-MB-231, ilk olarak 51 yaşında metastatik meme kanseri bir kadından plevral efüzyon yoluyla elde edilmiş meme kanseri hücre hattıdır (www.culturecollections.org.uk, Erişim tarihi: 17 Ekim 2022). ER, PR, e-kaderin negatiftir ve mutasyonlu P53 ifade eder (Kao ve ark., 2009). Büyüme faktörü reseptörü olan HER2'nin bulunmaması sebebiyle üçlü negatif meme kanseri modeli olma özelliği taşımaktadır (Welsh, 2013). Üçlü negatif meme kanseri, luminal olanlara göre daha agresif ve istilacı özellik göstermektedir. Metastatik özellikleri sayesinde hızla yayılır. Prognoz kötü seyrederken, ilaçlara karşı direnç oluşumu söz konusudur (Razak ve ark., 2019).

Antihormonal tedavi uygulanan hormon reseptör pozitif luminal tip, bazal tip meme kanserlerine oranla daha iyi bir prognoza sahiptir. Fakat üçlü negatif kanserler için tek seçenek kemoterapidir. Oldukça heterojen olan bu alt meme kanseri türünde kemoterapiye karşı zayıf bir yanıt ve güçlü bir direnç bulunmaktadır. Bu durum düşük toksisite ve yüksek etki gösteren doğal kökenli bileşikler ile geliştirilecek ilaç çalışmalarına olan ilgiyi artırmaktadır.

4.2. Polifenoller

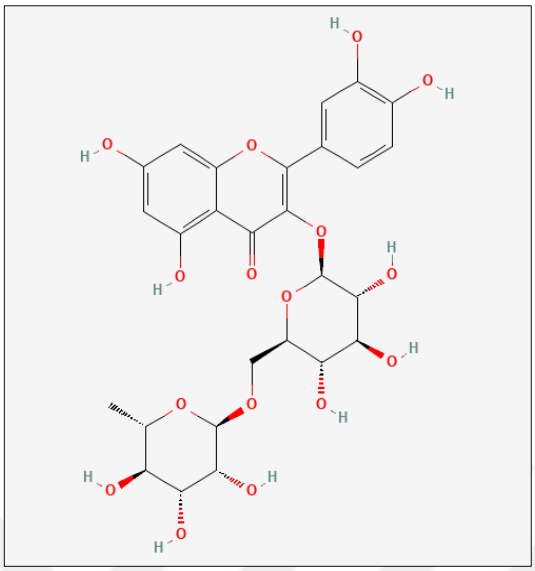
Polifenoller, bitkisel kaynaklı besinlerde bulunan en büyük fitokimyasallar grubudur. Bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu içeren aromatik halkaya sahip sekonder metabolitlerdir (Tsao, 2010). Kimyasal yapıları, kökenleri ve biyolojik işlevleri bakımından fenolik asitler, flavanoidler, lignanlar, stilbenler olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar (Bayır ve ark., 2019). Birçok polifenol, anti-inflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, kardiyoprotektif, yaşlanma karşıtı ve antikanserojen aktivite gibi çok sayıda biyolojik işleve sahiptir (Li ve ark., 2014). Bu sebeple polifenoller ilaç, kozmetik ve gıda takviyesi başta olmak üzere birçok alanda aktif olarak kullanılır.

4.2.1 Rutin ve farmakolojik özellikleri

Rutin, (rutoside, quercetin-3-O-rutinosid, sophorin veya P vitamini) çarkıfelek, karabuğday, çay, kahve, elma gibi bitkisel kaynaklarda bolca bulunan doğal bir flavonoid glikozittir (Ganeshpurkar ve Saluja, 2017b). Rutinin en büyük ticari kaynakları, *Ruta graveolens L.* (Rutaceae), *Okaliptüs spp.* (Myrtaceae) ve *Sophora japonica L.* (Fabaceae) türleridir (Chua, 2013).

Sarımsı renkte, 610,520 g/mol moleküler ağırlığında, suda düşük piridin içerisinde yüksek çözünürlüğe sahip tozdur. Rutinin pKa değeri 6,17 ve erime sıcaklığı 125°

C’dir (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805, Erişim tarihi: 18 Ekim 2022).



Resim 1. Quercetin 3-O-rutinoside ($C_{27}H_{30}O_{16}$) kimyasal yapısı (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805, Erişim tarihi: 18 Ekim 2022)

Rutin antioksidan özellikleri sebebiyle birçok farmakolojik uygulamada kullanılmaktadır. Kanser, diyabet, hipertansiyon, hiperkolestrolemi gibi kronik hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalarda sıklıkla rastlanmaktadır. Vücut içerisinde çeşitli nedenlerle birçok reaktif oksijen türleri (ROT) üretilmektedir. Bu serbest radikaller, normal metabolik süreçlerin patalojik değişimlere uğramasına sebep olmaktadır (Sharma ve ark., 2013). Rutin, yüksek oranda serbest radikalleri bağlama kabiliyetine sahiptir. Böylece DNA’yı çeşitli oksidatif hasar türlerinden koruyabilir.

İnflamasyonda görev alan bazı önemli enzimlerin inhibisyonunu rutin ile sağlamak mümkündür (Rabišková ve ark., 2012). TNF-α (tümör nekroz faktör alfa) üretimini ve NF-KB (NF-kappa B transkripsiyon faktörü) aktivasyonunu azaltır. IL-6 (interlökin 6), MAPK (mitojenle etkileşen protein kinaz), i-NOS (nitrik osit sentaz) ve COX-2 (prostoglandin endoperoksit sentaz 2) gibi önemli inflamatuvar belirteçleri azalttığı deneysel modellerde gösterilmiştir (Tian ve ark., 2019).

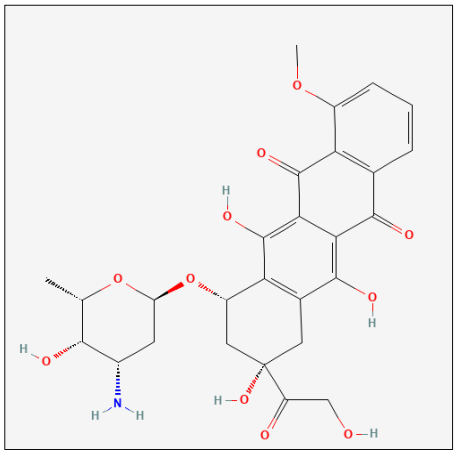
Rutinin, birçok insan kanser hücre hattında, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği bilinmektedir (Perk ve ark., 2014).

PI3K/Akt/mTOR, Wnt16 gibi önemli sinyal yolaklarının düzenleyerek veya Bcl-xL, Bax, Bcl-2, gibi apoptotik proteinlerin seviyelerini değiştirerek kanser hücrelerini inhibe etmektedir (Ghanbari-Movahed ve ark., 2022).

Literatürden edinilen bilgilere göre, polifenollerin çeşitli kemoteröpatik ajanlarla kombine edilmesi ile *in-vitro* çalışmalarda kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı, apoptozun indüklendiği, sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkinin azaldığı bilinmektedir (Somers-Edgar ve ark., 2008; Amin ve ark., 2010; Talcott, 2014). Karbon nanoliflerin rutin ile modifiye edildiği bu tez çalışmasında, hazırlanan kompozit yapının bir kanser ilacı olan DOX ile kombine edilmesi ile meme kanseri hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkisi ve sağlıklı hücreler üzerindeki biyouyumluluğu incelenecektir.

4.3. Doksorubisin

Doksorubisin (DOX) veya Adriamycin, 1970'lerde ilk kez *Streptomyces peucetius var. caesius* türü bakteriden izole edilmiş bir antrasiklin sınıfı kemoterapatik ajandır (Arcamone ve ark., 1969). Keşfedildiği yıllardan itibaren meme, akciğer, gastrik,over, tiroid, lenfoma, multiple myeloma başta olmak üzere birçok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır (Thorn ve ark., 2010).



Resim 2. Doksorubisin ($C_{27}H_{29}NO_{11}$) kimyasal gösterimi. (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin, Erişim tarihi: 20 Ekim

4.3.1 Doksorubisin etki mekanizması

DOX'un iki farklı etki mekanizması vardır. Bu mekanizmalardan ilki DNA üzerinden çalışmaktadır. Bilindiği üzere DNA hücre içerisinde sıkıca paketlenmiş halde bulunmaktadır. DNA'nın eşlenmesi, transkripsiyon ve DNA tamiri gibi süreçlerde DNA heliksinin gevşetilmesi gerekmektedir. DNA topoizomeraz enzimleri, DNA zincirlerini önce kırıp ardından tekrar birleştirerek sarmal yapıyı kontrol etmektedir (Champoux, 2001). Doksorubisin kanserli hücrelerde DNA'ya bağlanarak topoizomeraz II enzimini inhibe eder ve çift zincir kırılmasının ardından nükleotit ligasyonunu önleyerek hücrenin ölümüne neden olur (Gewirtz, 1999).

Bir diğer etki mekanizması ise ROT üzerinden gerçekleşmektedir. DOX, nitrik oksit sentazlar (NOS) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz enzimleri tarafından son derece kararsız yapıdaki semikinon radikaline indirgenir (Damiani ve ark., 2016). Kararsız yapıdaki bu yapının tekrar DOX'a dönüşmesi ile ortama ROT'lar salınır. Oluşan oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, membran ve DNA hasarı ile apoptoz tetiklenerek kanser hücresinin ölümü tetiklenir (Thorn ve ark., 2011b; Taymaz-Nikerel ve ark., 2018).

4.3.2. Doksorubisin yan etkileri

DOX oldukça etkili bir antikanser ajanı olmasına rağmen birçok hastada kardiyotoksisite göstermektedir. Doksorubisin kullanımı sırasında mitokondriyal fonksiyonların ve kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazının bozulması, serbest oksijen radikallerinin üretilmesi ve hücre ölümünü tetikleyen mekanizmaların aktive edilmesi ile kardiyomiyositler olumsuz etkilenmektedir (Zhao ve Zhang, 2017). Kardiyotoksisite ile iyon kanalları ve pompalarında işlev bozuklukları oluşur, kalp kaslarında geri dönüşümsüz hasarlar ve organ yetmezliğine varan sonuçlar meydana gelebilir (Wu, 2008).

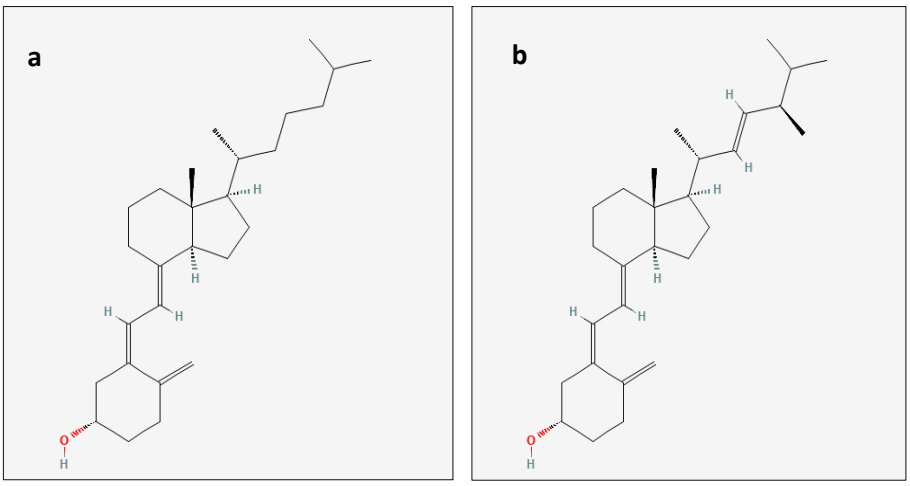
Kardiyotoksisitenin dışında bir diğer önemli sorun kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç kazanmasıdır. İlaç direncinin ana sebebi kanser hücrelerinin bol miktarda ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı (ABC) proteinleri ifade etmesidir (Fletcher ve ark., 2010). Bu pompalar, ilaç ve metabolitlerin hücre dışına atılmasına sebep olmaktadır. Bu durumda verilen ilaç dozu yetersiz kalmakta ve yüksek doz uygulanması halinde sağlıklı hücreler için sitotoksisite artmaktadır.

Gelişen ilaç direnci ve yüksek toksisite sebebiyle, DOX içeren ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması bir ihtiyaçtır. Literatürde, doksorubisin için son yıllarda karbon veya diğer nanopartiküllerin taşıyıcı sistem olarak araştırılmaya ve üretilmeye başlandığına dair çalışmalara rastlanmış olsa da karbon nanolif içeren bir taşıyıcı sisteme rastlanılmamıştır.

4.4. Vitamin D kaynakları ve biyosentezi

Vitamin D (VD), ilk olarak 1930 yılında Adolf Otto Reinhold Windaus tarafından kimyasal yapısı tanımlanan, enerji homeostası, bağışıklık ve endokrin sistemin düzenlenmesi gibi fizyolojik ve patofizyolojik birçok süreçte aktif rol alan bir hormondur (Blunt ve ark., 1968).

VD iki formda varolmaktadır: Vitamin D_3 (VD_3, kolekalsiferol) cildin güneş ışığına maruz kalmasıyla epidermis tabakasında üretimi başlayan form; vitamin D_2 (VD_2, ergokalsiferol) mayalarda ultraviyole ışınlarının etkisi ile sterol ergosterolden üretilen formdur (Nair ve Maseeh, 2012; Dominguez ve ark., 2021). VD_3 için en iyi doğal kaynaklar yağlı balık eti ve balık karaciğeri iken yumurta sarısı ve peynir gibi besinlerde de az miktarda bulunmaktadır (Mostafa ve Hegazy, 2015). Gıda takviyeleri ile dışarıdan vitamin D_2 ve D_3 alınabilmektedir ancak vücuttaki primer VD kaynağı sentez yoluyla oluşmaktadır (Houghton ve Vieth, 2006).



Resim 3a. Ergokalsiferol (C28H44O) kimyasal gösterimi **b.** Kolekalsiferol (C27H44O) kimyasal gösterimi. (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound, Erişim tarihi: 25 Ekim 2022)

Cildin, güneşin 290-320 nm dalga boyuna sahip ultraviyole B ışınlarına (UVB) maruz kalması ile vitamin D_3 sentezi başlamaktadır. İlk olarak provitamin D_3 olan 7-dehidrokolesterolden (7-DHK) B halkasının kırılmasıyla previtamin D_3 sentezlenir. Kararsız yapıdaki previtamin D_3 izomerleşerek vitamin D_3'ü oluşturur. Bu süreç enzimatik olmayan bir yol ile ısıya duyarlı şekilde gerçekleşmektedir. UVB yoğunluğu ve cilt pigmentasyon seviyesi D_3 oluşum hızını etkilemektedir (Holick ve ark., 1980). Derideki melanin miktarı UVB'nin 7-DHK 'ya ulaşmasını engellediğinden ciltte pigmentaston artıkça vitamin D_3 üretimi azalmaktadır (Webb ve ark., 1989).

4.4.1. Vitamin D metabolizması

Sentezlenen VD, vitamin D bağlayıcı protein (VDBP) aracılığı dolaşım sistemine aktarılarak karaciğere transfer edilmektedir. Diyet yoluyla alınan VD_2 ve VD_3 ise şilomikronlar ile önce lenf sistemine ardından kan dolaşımına geçerek karaciğere taşınmaktadır (Haddad, 1979).

VD metabolizması, paratiroid hormonun kalsiyum, fosfat ve VD'nin kendisi tarafından baskılanması ile uyarılır. İlk olarak karaciğere taşınan VD, sitokrom P450 karışık fonksiyonlu oksidaz enzim sistemi (CYP'ler) tarafından hidroksillenir. Başlıca CYP2R1 geni tarafından kodlanan 25-hidroksilaz enzimi vitamin D_2 ve D_3'ü 25. karbon atomundan hidroksiller (Zhu ve ark., 2013). Bu işlemin sonucunda kalsidiol, 25-hidrokolekalsiferol [25(OH)D], oluşmaktadır.

İkinci basamak böbreklerde gerçekleşmektedir. Renal proksimal tübüllerde, 1α-hidroksilaz (CYP27B) enzimi vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D'yi [$1,25(OH)_2D$], kalsitriol, katalizlemektedir (Takeyama ve ark., 1997; Bikle, 2009). Kalsitriolün, asıl rolü bağırsakları uyararak kan dolaşımına katılacak kalsiyum ve fosfat emilimini kontrol etmektir (Lappe ve ark., 2007). Vücutta ideal mineral dengesi sağlandığında 24-hidroksilaz enzimi aktif formdaki vitamin D'yi inaktif forma çevirmektedir (Dinour ve ark., 2013). Ayrıca VD'nin depolanan formu olarak bilinen kalsidiolü parçalar. Böylece $1,25(OH)_2D$ ve 25(OH)D'nin toksik seviyelere ulaşması engellenir (Schlingmann ve ark., 2011).

4.4.2. Vitamin D yetersizliği

Coğrafi konum sebepli güneş ışığına az maruz kalmak, yetersiz beslenme, Crohn, çölyak vb. hastalıklar, karaciğer ve böbrek rahatsızlıkları sebebiyle aktif VD metabolitlerinin oluşumunun azalması, VD'nin biyolojik etkilerine karşı gelişen direnç ve kullanılan bazı ilaçlar sebebiyle birçok toplumda VD yetersizliği sıklıkla görülmektedir (Holick ve Chen, 2008b; Kimlin, 2008). Yıl boyunca etkili güneşe maruz kalmayan 65 yaşından küçük yetişkinler için eksikliği önlemek adına günde 600 ile 800 ünite D_3 vitamini tüketilmesi önerilmektedir (Sizar ve ark., 2022).

Hedef hücredeki genlerin transkripsiyonunu düzenlemekle görevli bir transkripsiyon faktörü olan VD reseptörleri (VDR) kalp, deri, böbrek, bağırsak gibi birçok organda ve hücre tipinde ifade edilen nükleer reseptörlerdir (Kato, 2000; Bouillon ve ark.,

2021). VDR'lerin ifadelenmesinde meydana gelen bozukluklar sonucu VD fonksiyonlarını yerine getirememektedir (Dowd ve MacDonald, 2013).

VD yetersizliği, diyetle alınan kalsiyum ve fosfor emiliminde azalmaya ve böylece PTH seviyelerinin yükselmesine sebep olur. Bu durumda iskelet problemleri ve kemik erimesi gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Wacker ve Holiack, 2013). VD_3'ün, inflamasyon, bağışıklık sistemi, hücre döngüsü, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok önemli sinyal yolağında görev alması ile eksikliği durumunda obezite, insülin direnci, kardiyak hipertrofi, ateroskleroz ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde rol aldığı yapılan klinik araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Khammissa ve ark., 2018). Ek olarak, VD'nin çeşitli kemoterapi ajanlarının anti-tümor aktivitesini güçlendirdiğine dair önemli kanıtlar mevcuttur (Sundaram ve ark., 2000; Posner ve ark., 2001). VD'nin vücuttaki emilimi ve biyoyararlanımı noktasında sıkıntılar yaşanması, hiperkalsemi gibi sitotoksik etkiler gözlemlenmesi ve DOX'un sebep olduğu yan etkiler göz önüne alındığında; ilaç yükleme kapasitesi yüksek, stabil ve modifiye edilebilir karbon nanoliflere yüklenmesi ile bahsedilen negatif bulguların ortadan kalkabileceği öngörülmektedir.

4.5. Nanomalzemeler

Nanomalzemeler (nanopartiküller), en az bir boyutu 1-100 nm arasında değişiklik gösteren doğal olarak meydana gelmiş veya kimyasal, mekanik, biyolojik olarak sentezlenmiş malzemelerin genel adıdır (Saleh ve Gupta, 2016). Nanomalzemeler, köken (doğal veya- antropojenik), kimyasal bileşim (organik veya inorganik), oluşum şekli, boyut ve şekil özellikleri, uygulama alanı olmak üzere çeşitli özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır (**Tablo 2**) (Chen ve ark., 2018; Das ve ark., 2020).

Nanomalzemeleri kimyasal bileşimine göre 4 ana gruba ayırmak mümkündür. Metal bazlı nanomalzemeler; altın, gümüş, bakır gibi malzemelerden veya titanyum, silika, alüminyum gibi metallerin metal oksitlerini içermektedir (Fu ve ark., 2021).

Karbon bazlı nanomalzemeler; çoğunlukla karbon atomlarından meydana gelen içi boş küreler, elipsoidler, tüp veya lif (fiber) şeklinde yapılardır. Fullerenler, karbon nanotüpler, grafen ve türevleri bu sınıfta yer alır (Patel ve ark., 2019).

Nanokompozitler, çok fazlı malzemeler olarak tanımlanır. Malzemelerden en az birinin nanoölçekli boyuta sahip olduğu birden fazla malzeme içerir. Kolloidler ise karbon-metal oksitler ve jel yapıları içermektedir (Luo ve ark., 2014). Dendrimerler; dallanmış birimlerden meydana gelen nanoboyutlu polimerlerdir (Abbasi ve ark., 2014).

Tablo 2. Yapı boyutuna göre nanomalzemelerin sınıflandırılması.

Boyutsal yapı	**Nanomalzeme**
Sıfır boyutlu nanomalzemeler (0D); x, y, z boyutlarının hepsi 1-100 nm nanoölçeğindedir.	Kuantum noktalar, nanoküreler, nanolensler
Tek boyutlu nanomalzemeler (1D); iki boyutu nanoölçeğe uyarken, bir boyutu 100 nm'den büyüktür.	Nanoteller, nanorod, metal nanotüpler, metal oksitler
İki boyutlu nanomalzemeler (2D); iki boyutu nanoölçeğe uymazken, bir boyutu 100 nm'den küçüktür.	Nanotabakalar, nanoduvarlar, nanofilmler, nanokaplamalar
Üç boyutlu nanomalzemeler (3D); 100 nm'den büyük üç boyuta sahiptir ancak sahip oldukları nanokristal yapı nanoölçekteki özellikleri içermektedir.	Elmas ve grafit gibi polikristal, toz yapılı, çok katmanlı, lifli malzemeler

4.5.1. Karbon bazlı nanomalzemeler

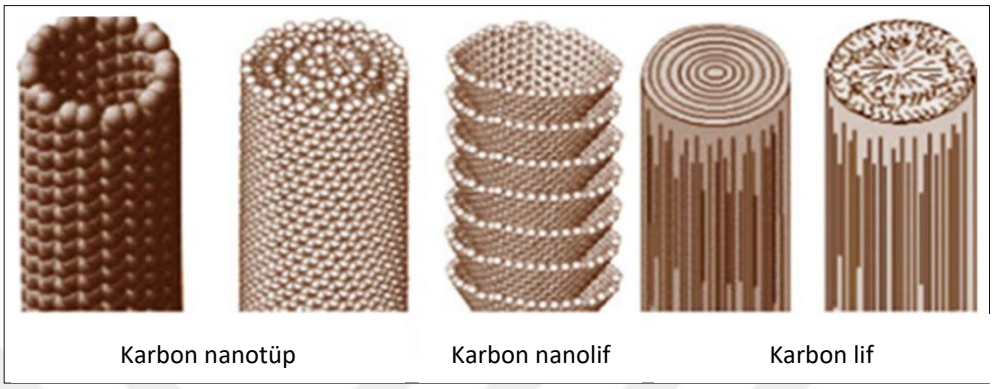
Karbon, evrende oksijen ve hidrojenden sonra en çok bulunan üçüncü elementtir. Doğada birkaç farklı formda varolabilmekle beraber en yaygın bulunan biçimi grafittir. Grafit, altıgen bir yapıya sahip yığılmış karbon tabakalarından meydana gelmektedir. Karbonun yüksek basınç ile sıkıştırılmasıyla ise yarı kararlı bir karbon formu olan elmas oluşmaktadır (Kumar ve Kumbhat, 2016). Uzun bir süre boyunca grafit ve elmas bilinen tek karbon allotroplarıyken 1985'de fullerenlerin keşfi ile karbon bazlı nanomalzemelerin ilerleyişi başlamıştır. 1991'de bu gruba silindirler halinde kesintisiz yuvarlanmış grafit levhalardan oluşan karbon nanotüpler eklenmiştir (Patel ve ark., 2019).

Fullerenler ve karbon nanotüplere ek olarak, grafen ve türevleri, grafen oksit, karbon nanolifler, nanoelmaslar, karbon bazlı kuantum noktalar günümüzde bilinen diğer karbon temelli nanomalzemelerdir. Bu malzemelerin farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri, atomların yapısal geometrisi ve moleküller içindeki kimyasal bağların türü tarafından belirlenmektedir (Zaytseva ve Neumann, 2016). Karbon bazlı nanomalzemeler, boyutları, mekanik, elektrik, termal, optik ve kimyasal özellikleri ile biyomedikal ve endüstriyel birçok alanda kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2002).

4.5.2. Karbon nanolifler

Karbon nanolifler (nanofiber), grafen katmanlarının belirli bir oryantasyona göre üst üste yığılmasıyla oluşan 10 ile 100 nm arası çap ölçüsüne sahip flamentlerdir (Ruiz-Cornejo ve ark., 2020). Sahip oldukları küçük çap ölçüsüyle birkaç mikrometrelik çap ölçüsüne sahip olan geleneksel karbon liflerden ayrılmaktadır. Geniş yüzey alanı ve 10 μm'ye varan filament boyları vardır (Wang ve ark., 2019b). Geometrik olarak konik şekilli tabakaların istiflenmesi ile hem iç hem dış katmanlarında aktif yüzeyler oluşturur (Endo ve ark., 1976; "Carbon-Based Nanomaterials", 2008). Böylece birçok molekül ile fonksiyonelleştirilebilmektedir.

Boy-en oranının büyük olması sayesinde yükleme kapasitesi fazladır. Karbon nanolifler, yüksek elektriksel iletkenliklik gösterir (Kumar ve ark., 2002). Polimerik kompozitlere dahil edildiğinde polimerin gerilme, sıkıştırma, tabakalar arası kesme kuvvetini artırabilir (Endo ve ark., 2003; Finegan ve ark., 2003).



Resim 4. Grafit karbon allotroplarının morfolojisi (Restivo ve ark., 2020)

Karbon nanolifler, üretiminde kullanılan sentez tekniğine göre farklı karbon yapıları ve morfolojilerine sahip olabilir. En yaygın olarak kullanılan sentez yöntemi, metan, etan, karbon monoksit gibi hidrokarbon gazların karbon öncülleri olarak kullanıldığı katalitik kimyasal buhar biriktirme yöntemidir (Mohamed, 2019). Bir diğer yaygın teknik ise yüksek elektriksel alan içesinde polimerik nanoliflerin oluşmasında etkili olan elektrospin yöntemidir. Sistemin kontrol edilebilmesi ve çevreyle uyumlu olması sebebiyle diğer yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır (Wang ve ark., 2018).

Karbon nanolifler, sentez basamaklarında kullanılan yöntemler ve öncüllerinin doğada bolca var olmasından dolayı diğer değerli metaller ile kıyaslandığında düşük maliyetli ve çevreci bir yaklaşım sunmaktadır (Serp ve Figueiredo, 2008). Yüzey alanı, por büyüklüğü, elektriksel, termal ve mekanik özellikleri ile elektronların taşınması, ısı dağılımı, uzun süre kararlılığını koruması açısından avantaj sağlar.

Bu özellikleri sebebiyle, enerji dönüştürme cihazları, enerjininin iletimi, enerji depolama teknolojileri gibi alanlarda avantaj sağlamaktadır (Arico ve ark., 2010; Ruiz-Cornejo ve ark., 2020). Ayrıca, kolayca modifiye edilebilir olması veya farklı moleküller ile fonksiyonelleştirilerek hibrit yapıların tasarlanabilmesi sayesinde biyosensör, ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği gibi biyomedikal alanlarda ve çevre kirlenmesi-korunması gibi konularda tercih edilmektedir (Wang ve ark., 2019b).

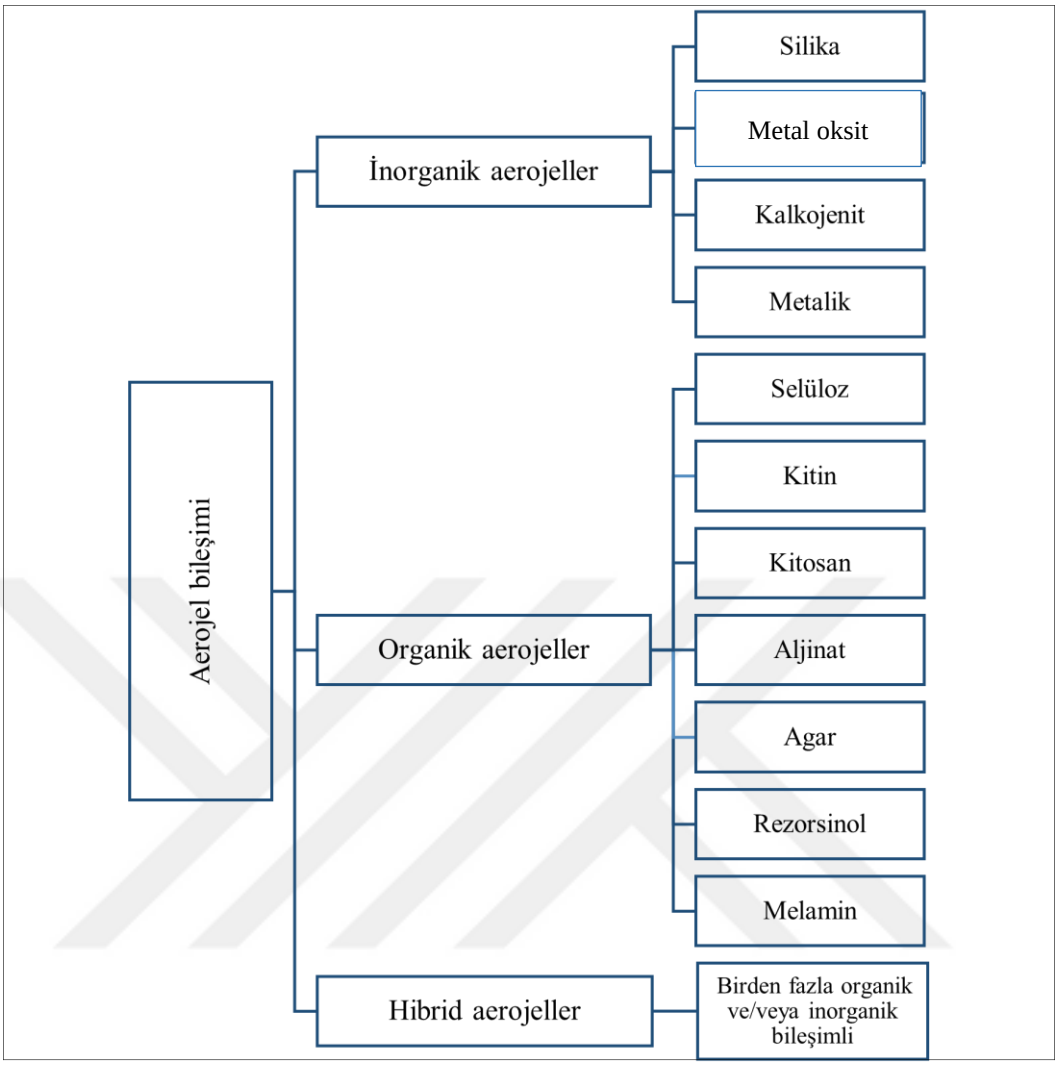
4.6. Aerojel

Aerojel kavramı organik, inorganik veya hibrit moleküler öncüllerden türetilmiş ultra düşük yoğunluklu ve hafif malzemeler için kullanılır (Noman ve ark., 2021). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği aerojeli "dağılmış fazın bir gaz olduğu, mikrogözenekli bir katıdan oluşan jel" şeklinde tanımlamaktadır (IUPAC, 2008).

Aerojel yapısı yaklaşık %99,9'u hava içermesi sebebiyle çok gözenekli (porlu) ve 3 boyutlu bir yapıya sahiptir (Azum ve ark., 2021). Aerojeller, katalitik ve elektrokimyasal reaksiyonlar için geniş yüzey alanı sağlar. %90-99 oranında pora sahip olmasının yanı sıra bu porların oldukça küçük boyutta olmasıyla termal iletkenliği (005 – 0,1 W/mK) oldukça düşüktür. Yüksek ses emilimi ve düşük ses hızı (Sönümleme > 50 dB, vl ≈ 100 m/s) ve düşük dielektrik sabiti vardır (Ghodake ve Londhe, 2018). Metil grubu (-CH_3) gibi polimerik rezidüler içerdiklerinden hidrofobik özellik gösterirler. Genelde şeffaf olmalarına rağmen opak veya renkli olacak şekilde üretimleri sağlanabilir (Mohammad ve ark., 2021).

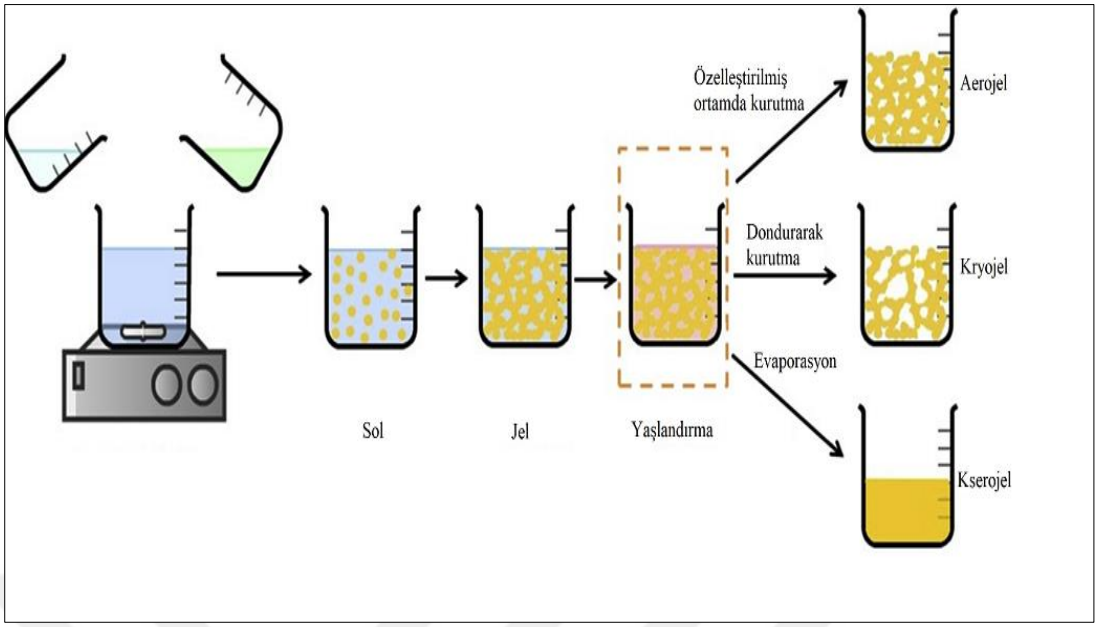
4.6.1. Aerojellerin sınıflandırılması ve üretimi

Aerojeller görünüşleri açısından monolit, toz veya film şeklinde olabilir. Gözenek boyutları mikrogözenekli (<2 nm), mezogözenekli (2~50 nm) ve karışık-gözenekli olacak şekilde değişkenlik gösterir (Du ve ark., 2013). Üretimlerinde kullanılan yöntem farkına göre aerojel, kserojel, kryojel veya hidrojel olarak 4 gruba ayrılırken, sınıflandırmak için en kabul edilen bakış açısı bileşimlerine göre yapılan sınıflandırmadır (Moheman ve ark., 2021).



Şekil 1. Aerojellerin bileşimlerine göre sınıflara ayrılması.

Organik, inorganik ve hibrit aerojel üretimi için sol-jel yöntemi en çok tercih edilen kimyasal yöntemlerin başında gelmektedir. "Sol'' basamağı, küçük katı nano ölçekli parçacıkların bir çözücü içerisinde dağılması sonucu kolloidal süspansiyonların hazırlanmasını kapsar. Ardından polimerizasyonu başlatacak asit veya baz bir katalizörün eklenmesi ile çarpraz bağlanan ve dallanan parçacıklar ''jel'' halini alır. Jelin dayanıklılığını artırmak için solüsyon içerisinde olgunlaştırılması ve uygun yöntemlerle kurutulmasının ardından sentez tamamlanır (Dervin ve Pillai, 2017). Bu yöntem ile mekanik açıdan daha sağlam, kararlı yapıda ve yüksek gözenekli aerojellerin üretimi sağlanır (**Şekil 2**).



Şekil 2. Sol-jel metodu ile aerojel üretimi ((Soorbaghi ve ark., 2019), değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.6.2. Aerojeller ve Biyomedikal Uygulamalar

Aerojeller, sahip olduğu mekanik ve fizikokimyasal özellikleri sayesinde ses ve ısı yalıtım malzemeleri, elektrotlar, enerji sistemi parçaları ve sensör olarak kullanılmaya elverişlidir. Geniş yüzey alanı ve yüksek adsorpsiyon gücü ile atık yağ temizleme ve su arıtımı gibi çevresel uygulamalarda da tercih edilmektedir (Azum ve ark., 2021)

Tıbbi alanlarda kullanılan her malzeme, alerji, enflamatuvar yanıtı, pıhtılaşma-hemoliz ve kanserojen özellikler gibi biyolojik yan etkiler bakımından testlere girmektedir. Selüloz, aljinat, kitosan gibi farklı organik moleküller içeren aerojellerin biyouyumluluklarının araştırılmaya başlanması ile ilaç taşıma sistemleri, doku iskeletleri, biyoalgılama, anti mikrobiyal ürünlerin geliştirilmesi, tanı ve teşhis kitleri gibi biyomedikal uygulamalardaki kullanımı hız kazanmıştır (Ahmad ve ark., 2021).

Yüzey özellikleri ve geniş yükleme kapasiteleri sayesinde biyoaerojeller, hedeflenen bölgelere fizyolojik ortam şartlarından ilacı koruyarak dağıtım yapabilmekte ve pH, sıcaklık gibi parametrelere bağlı olarak kontrollü bir şekilde ilacı salabilmektedir (Hoepfner ve ark., 2008; Tsutsumi ve ark., 2014). 3D yapıları sayesinde biyolojik moleküller ile kombinlenerek proteinler ve büyük biyomoleküllerin tespit edilmesini sağlayan biyosensörler geliştirilmektedir (Org ve ark., 2017). Doku mühendisliği çalışmalarında karşılaşılan donör kıtlığı, patojen bulaşma riski ve istenmeyen bağışıklık yanıtı gibi durumlar sebebiyle 3D yapı iskeletleri geliştirilmektedir. Aerojellerin çok gözenekli yapısı ve yüzeyinin hidrofobisite oranı hücrelerin iskelete adezyonunu etkilemektedir. Porlar, besin ve oksijen temini için ideal bir ortam sağlamaktadır (Schmedlen ve ark., 2002; Sehaqui ve ark., 2011). Biyoaerojeller, nispeten düşük maliyetleri, düşük toksisite göstermeleri, basit üretim teknikleri ve biyouyumlulukları sayesinde biyomedikal uygulamalar için tercih edilmektedir (Yin ve Rubenstein, 2011).

Bütün bu bilgilerin ışığında, gerçekleştirilen bu tez çalışmasında antioksidan kapasitesi yüksek bir flavanoid olan rutin kullanılarak modifiye edilen aktif karbon nanoliflerin, DOX ve VD ile yüklenmesi sonucu MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki olası antiproliferatif, apoptotik ve hücre göçü önleyici etkisi araştırılmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Hücre kültürü ekipmanları

- CO2 inkübatörü: SANYO MCO-19A1C (UV)
- Laminar akımlı kabin: ESCO Class II Biosafety Cabinet LP-4S1I 2009-43648
- Santrifüj: Hettich UNIVERSAL 320
- Işık mikroskobu: OLYMPUS CKX41
- xCELLigence: Acea Biosciences 3X16
- Microplate reader: Epoch BioTek Instruments 254732
- Floresan mikroskop: Olympus, BX50
- Otoklav: BioTek NB1045
- Mikropipet: RAININ Pipet-Lite XLS 10 µl, 100 µl ve 1 ml, BIOHIT PROLİNE 20-200 µl
- Otomatik pipet: CappAid
- Flask: TPP, 90026, filter screw caps, 25 cm^2
- Falkon tüp: CAPP, Bluecapp 50 ml steril, 5100050
- Ependorf: UltraCruz, 2 ml mikrosantrifüj steril tüp, sc-200273
- Steril serolojik pipet: CAPP, 5ml, SP-5-C
- Steril plakalar: TPP, 96 kuyucuklu mikroplaka - 92096, 24 kuyucuklu mikroplaka - 92424, 6 kuyucuklu mikroplaka - 92006

5.1.2 Laboratuvar gereçleri

- Hassas terazi: Weightlab instruments WSA-224
- Distile su cihazı: GFL 2002-1008974151
- Buz makinesi: SPT IM-662C: 66 Ibs Automatic Stainless Steel Ice Maker
- Ultrasonik banyo: Wise Clean WUC-A03H
- Etüv: Heraeus Thermo Scientific 40918100

- Manyetik karıştırıcı: ISOLAB Fuse T315 A1 250VAC
- Çeker ocak: Hedlab
- Vertikal karıştırıcı: İsolab MX-RL-Pro
- Çalkalamalı su banyosu: GFL 2002- 108914151
- Homojenizatör: IKA R104
- Ultrasonikatör: Bandelin UW 3100
- Microplate reader: RAYTO RT-2100C
- Santrifüj: Hettich UNIVERSAL 32R
- Vorteks: İKA, MS2 minishaker
- pH ölçer: Mettler Toledo
- UV spektrofotometre: SHIMADZU UV- 1700
- Florometrik ölçüm cihazı: Promega Glomax Multi Detection System
- Mikropipet: İsolab 1ml, Eppendorf research 10ml

5.1.3 Kimyasallar

- Rutin: Aromel P Vitamini Rutine, Pharma Grade
- Vitamin D: 1,25(OH)2D3, Zhejıang Garden Biochemical SDS202008032A
- Doxorubicin hydrochloride: Sigma- Aldrich, D1515-10MG
- Karbon nanolif: Sigma- Aldrıch 719811-25G
- Sodyum aljinat: Sıgma- Aldrıch W201502-1KG
- Medyumlar: Gibco Dulbecco′s Modified Eagle′s Medium/High Modified (DMEM) ve Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12 (DMEM F12)
- Phosphate-buffered saline (PBS), Gibco, 20012027
- Fetal Bovine Serum (FBS), PAN Biotech, P30-193306
- Penicillin/Streptomycin Solution (10x), Capricorn, PS-B
- Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, 41640
- Ethanol Absolute, Sigma-Aldrich, 32221-2,5 L
- %85 fosforik asit (H_3PO_4), Merckmillipore, 7664-38-2
- Kalsiyum klorid ($CaCl_2$), Merckmillipore, 10043-52-4

5.2. Yöntem

5.2.1. Karbon nanoliflerin aktifleştirilmesi

Karbon nanolifleri (CNF), çözünebilen safsızlıklardan arındırmak amacıyla distile su ile manyetik karıştırıcıda 24 saat yıkandı ve ardından etüvde kurutuldu. 3 g yıkanmış ve kurutulmuş CNF tartıldı. Çeker ocak ortamında 50 ml %85 H3PO4 (fosforik asit) eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra beherin ağzı parafilm ile kapatılarak 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Bekletilen sürenin sonunda 250°C'deki etüv ortamına alındı. Etüvden çıkarılan CNF'in üzerine 200 ml distile su (dH_2O) eklendi ve manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Hazırlanan karışım 50 ml hacimli falkon tüplere eşit miktarlarda dağıtıldı ve 5000 rpm/30 dakika süresince santrifüj edildi. Asidi uzaklaştırmak amacıyla süpernatant dökülerek tekrar dH_2O eklendi ve bu işlem ortam pH'sı nötr pH değerine ulaşana kadar tekrarlandı. pH sabitlendikten sonra 85°C'deki etüvde kurutuldu. Bu örnekler aktif CNF (ACNF) olarak adlandırıldı.

5.2.2. Rutin ile modifiye edilmiş ACNF'e VD ve DOX yüklenmesi

CNF'in aktifleştirilmesi işleminden sonra oluşan ACNF 300 mg tartıldı. Üzerine bir miktar distile su eklendikten sonra homojenizatör ve ultrasonik banyo ile dispersiye hale getirildi. 300 mg tartılan Rutin, 2 ml DMSO ile tamamen çözündükten sonra hazırlanan ACNF karışımına eklendi ve son hacim 200 ml distile suya tamamlandı. 37°C sıcaklıktaki karıştırmalı su banyosunda 24 saat boyunca çalkalandı. 24 saatin sonunda numunenin, 15 dakika/5000 rpm santrifüj ayarında çökmesi sağlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra aynı ayarda bir tur distile su ile yıkanan numune 37°C'deki etüv ortamında kurutuldu.

Kuruyan ACNF-Rutin 150 mg tartıldı ve yukarıda anlatılan şekilde dispersiye hale getirildi. 100 mg VD, 2 ml etanol ile çözüldü. 1,5 mg DOX distile su ile çözüldü. VD ve DOX aşağıda belirtilen kombinasyonlarda, Rutin ile modifiye edilmiş ACNF örneklerinin üzerlerine eklenip hacim 200 ml distile suya tamamlandı.

Numuneler 37°C sıcaklıktaki karıştırmalı su banyosunda 24 saat boyunca çalkalandı. 24 saatin sonunda 15dakika/5000 rpm santrifüj ayarında çökmeleri sağlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra aynı ayarda bir tur distile su ile yıkanan numuneler 37°C'deki etüv ortamında kurutuldu.

Bu aşamada hazırlanan numuneler aşağıdaki gibidir.

- ACNF- Rutin (ACNF-R)
- ACNF-R-VD
- ACNF-R-DOX
- ACNF-R-VD-DOX

5.2.3. Aerojellerin hazırlanması

Bölüm **5.2.2.**'de hazırlanan örneklerden 4 mg tartıldı . Üzerlerine 10 ml distile su eklendikten sonra 20 dakika boyunca homojenizatör kullanılarak dispersiyon hale getirildiler. Böylelikle herbir numune 0,4 mg/ml derişimde olacak şekilde hazırlandı.

2 g sodyum alijinat, 100 ml distile su ile çözülerek stok çözelti hazırlandı. Her bir numune için 10 ml sodyum alijinat çözeltisi alınıp hazırlanan dispersiyonların üzerine manyetik karıştırıcı kullanılarak damlatma yoluyla yavaşça eklendi. Numuneler 10 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra 3 g $CaCI_2$ içeren 100 ml distile su çözeltisi üzerine damla damla eklenerek aerojeller oluşturuldu. 24 saat boyunca oda sıcaklığında CaCI2 içerisinde olgunlaştırılan aerojeller, 3 tur distile su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. Ertesi gün aerojeller 37°C'deki etüvde 10 saat kurutuldu.

Bu aşamada hazırlanan aerojeller aşağıdaki gibidir.

- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF- R)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R-VD)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R-DOX)

- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R-VD-DOX)

Yukarıda anlatılan aerojellerin hazırlanmasına ek olarak, aerojel oluşumu sırasında ACNF-Rutin ikilisine VD ve DOX eklenmesi durumu incelendi. Bu kısımda ACNF-Rutin'den 4'er mg tartılarak üzerlerine 5 ml distile su eklendi. Örnekler homojenizatör ile 20 dakika dispersiye edildi. Daştan'ının yüksek lisans tezinden elde edilen veriler doğrultusunda 0,717 mg VD, 1 ml etanolde (Daştan, 2022) ; 1,5 mg DOX, 3 ml distile su ile çözüldü. Manyetik karıştırıcı kullanılarak, hazırlanan çözeltiler Bölüm **5.2.2.'** de belirtilen kombinasyonlarda ACNF-Rutin dispersiyonlarının üzerine eklendi. Son hacim 10 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Örnekler 10 dakika boyunca karıştırıldı. Hazırlanan karışımların üzerine daha önce anlatılan şekilde hazırlanan 10 ml sodyum alijinat çözeltisi eklendi ve meydana gelen karışım 3 g $CaCI_2$ içeren 100 ml distile su çözeltisi üzerine damla damla eklenerek aerojeller oluşturuldu. Sonraki aşamalar daha önce açıklanan aerojel sentezindeki basamaklar şeklinde tekrar edildi.

Bu aşamada hazırlanan aerojeller aşağıdaki gibidir.

- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R + VD)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R+ DOX)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R + VD + DOX)

5.2.4. Aerojel ve ACNF-Rutin karakterizasyonu

ACNF ve üretilen aerojellerin yüzey yapısı ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu kullanıldı (TEM). TEM (Zeiss EVO MA 10) ile numunelerin morfolojik özellikleri karakterize edildi. Numunelerin FTIR spektrumlarını kaydetmek için Varian 800 FTIR (Fourier transform kızılötesi) spektrometresi kullanıldı. XRD analizi için Shimadzu XRD 6100 kullanıldı.

5.2.5. Hücre kültürü

Geliştirilen ilaç taşıyıcı karbon nanosistemlerin meme kanseri hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ile çalışıldı. Hazırlanan numunelerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amacı ile fare embriyonik fibroblast hücre hattı NIH3T3 kullanıldı. NIH3T3 ve MCF7 için %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin karışımı içeren DMEM/F12 besiyeri, MDA-MB-231 için %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin karışımı içeren DMEM besiyeri kullanıldı.

%5 CO_2 ve 37°C'lik atmosfer koşullarının sağlandığı inkübatör ortamında hücreler kültüre edildi. Hücrelerin %80-90 konfluent hale gelmesinin ardından Tripsin-EDTA uygulaması ile tutundukları flask yüzeyinden ayrılmaları sağlanıp, 25 cm^2 'lik flasklara pasaj işlemi yapıldı.

5.2.5.1. Hazırlanan ilaç taşıyıcı karbon nanosistemin meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif aktivitesinin belirlenmesi

Hazırlanan nanomalzemenin antiproliferatif ve sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi için MTT yöntemi ve daha uzun zaman dilimlerindeki antiproliferatif etkinliğin ortaya çıkarılması amacıyla "Gerçek Zamanlı Hücre Ölçer" cihazı kullanıldı.

MTT yöntemi: MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid), hücre proliferasyonunu, hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi ölçmede kullanılan kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntem, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanmaktadır (Beekman ve ark., 1997). Tetrazolium tuzları (MTT, XTT, WST-1), genelde substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucu renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolium tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz (SDH) enzimine 30 spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur.

Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler bu ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Formazan tuzları, DMSO, izopropanol gibi organik solventlerde kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi spektrofotometrik olarak ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir.

MTT çözeltisinin hazırlanışı: Çalışmada kullanılacak yöntem için ticari olarak satın alınan "Vybrant Mtt Cell Proliferation Assay Kit" (Thermo Fischer, USA) kullanıldı. Paket içerisinde bulunan 5 mg MTT boyası, 1 mL steril fosfat tamponu (PBS) içinde çözüldükten sonra iyice vortekslenerek ve çözünmeyen kısımlar santrifüjlenerek üstteki sıvı steril bir ependorfa alındı. Işığa karşı hassas olan MTT çözeltisi kullanılıncaya kadar +4ºC'de karanlıkta saklandı.

96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması: NIH3T3, MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları öncelikle Thoma lamı ile sayımı yapılarak kuyucuk başına 10 000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları ışık mikroskobu ile incelendi. Kuyucuklara ekilen hücreler, her bir kuyucukta 200 µl besiyeri olacak şekilde inkübatöre kaldırılarak 24 saat inkübe edildi.

İlaç yüklü karbon nanosistemlerin hücrelere eklenmesi: 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelere, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış karbon bazlı nanomalzemeler eklenerek tekrar inkübatöre kaldırıldı. Çalışmada kullanılan örnekler ve içerikleri aşağıdaki şekildedir.

- ACNF
- ACNF-R
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF- R)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R-VD)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R-DOX)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R-VD-DOX)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R + VD)

- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R+ DOX)
- 0,4 mg/ml Aerojel (ACNF-R + VD + DOX)

MTT deneyinin yapılışı: hücrelerin kuyucuklara ekilmesinin ardından 48. saate gelindiğinde, kuyucuklara eklenen 200 µl besiyeri mikropipet ile çekilip atıldı. Kuyucuklar 200 µl PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 100 µl taze besiyeri ve 10 µl MTT solüsyonu eklendikten sonra 4 saat boyunca inkübatöre kaldırıldı. 4 saatlik sürenin sonunda kuyucuklara 100µl sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenerek MTT ile olusan formazon kristallerini çözmek için 12 saat boyunca inkübe edildi. Sürenin sonunda, mikroplate okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyunda okuması yapıldı.

Hiçbir madde eklenmeyen kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer % 100 kabul edildi. Sentez bileşikleri içeren kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edildi. Bu deneyler, her bir hücre tipi için örnekler en az 3 tekrarlı olarak 3 farklı zamanda yapıldı.

Gerçek zamanlı hücre ölçer cihazı ile antiproliferatif etkinliğin belirlenmesi: Bu sistemin temeli, hücreler üzerinde herhangi bir işaretleme yapmadan, sisteme özel tasarlanmış olan e-plakaların zemininde bulunan ve altın içeren mikro-elektrotlar sayesinde hücrelerden alınan elektriksel empedansın ölçümüne dayanmaktadır. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumları hakkında kantitatif bilgi verir. Bu yöntem, "end-point" yöntemlerle elde edilmesi mümkün olmayan verilerin elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilecek hücre indeksi parametresinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu e-plaka kullanıldı. Öncelikle e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklendikten sonra cihaza konularak "background" ölçümleri yapıldı. Daha sonra hücreler için 100 µl besiyerinde 10 000 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapıldı.

Bu işlemin ardında plakalar 30 dakika boyunca steril çalışma kabini içerisinde inkübe edildikten sonra xCELLigence DP (Roche) cihazındaki yerlerine yerleştirilerek 37°C ve %5 CO2 ortam şartlarında inkübe edildi. E-plakalara hücre ekimi

gerçekleştirildikten sonra xCELLigence DP cihazına her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verildi.

Hücre ekiminden 24 saat sonra hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde e-plakalardaki besiyeri çeşitli konsantrasyonlardaki karbon nanolif konsantrasyonlarını içeren besiyeri ile değiştirilerek 120 saat süresince 15 dakika aralıklarla ölçüm alınmaya devam edildi. Konsantrasyona ve zamana bağımlı hücre indeksi değerlerine ait grafikler bilgisayar ekranına aktarılarak analizler gerçekleştirildi.

5.2.5.2.Hücre migrasyonu üzerindeki etkinin belirlenmesi

Meme kanseri hücrelerinin migrasyonu üzerine hazırlanan karbon nanosistemin etkisini belirlemek amacıyla yara açma deneyi yapıldı. Yapılan MTT analizleri sonucu normal hücreler üzerinde en düşük seviyede sitotoksik etkiye sahip ACNF-R + VD +DOX kompozitini içeren aerojel numune kullanılarak migrasyon deneyleri gerçekleştirildi.

Yara açma (wound healing) analizi: Yara kapanma deneyi için hücreler 24 kuyucuklu plakalara (her kuyucukta $1x10^2$ hücre) ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından 24 saat %0 FBS'li medyum ile tekrar inkübasyona bırakıldı.

Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri alınarak, düz bir çizgi halinde 100 µl steril pipet ucuyla birbirine paralel yaralar (çizgi) açıldı. 3 kez steril PBS ile yıkanıp kalkan hücreler ortamdan alındıktan sonra %1 FBS'li besiyeri içerisinde hazırlanan karbon nanolifler çeşitli konsantrasyonlarda eklendi. 0, 24 ve 48 saatlerde görüntüleri kaydedildi ve yara kapanması kontrol edildi.

5.2.5.3.Apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının belirlenmesi

Meme kanseri hücrelerinde olası apoptotik mekanizmanın araştırılmasında biyokimyasal ve morfolojik yöntemler kullanıldı. Yapılan MTT analizleri sonucu normal hücreler üzerinde en düşük seviyede sitotoksik etkiye sahip ACNF-R + VD +DOX kompozitini içeren aerojel kullanılarak kaspaz enzim aktivasyon ölçüm deneyleri yapıldı.

Kaspaz enzim aktivasyonu: Ticari olarak satın alınan kaspaz 3, 8 ve 9 kitleri ile aktivasyon ölçülüp hangi yolak veya yolakların etkili olduğu spektrofotometrik olarak belirlenmeye çalışıldı. Her 3 kaspaz proteini enzimatik olarak ölçüldü (Şenkarde| ve ark., 2016).

Kaspaz-3 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz-3 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınan olan kaspaz-3 deney kitinde (NOVUS, Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit) belirtilen yöntem ile ölçüldü. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi peptid substrat Acetyl Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilid'in (Ac-DEVD-pNA) kaspaz-3 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan p-nitroanilid (pNA) miktarının 405 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz 9 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınacak olan kaspaz-9 deney kitinde (NOVUS, Caspase-9 Colorimetric Activity Assay Kit) belirtilen yöntem ile ölçüldü. Peptid substrat Ac-LEHD-pNA kaspaz-9 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan pNA nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-9 aktivitesi hesaplandı.

Kaspaz -8 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz-8 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınan olan kaspaz-8 deney kitinde (NOVUS, Caspase-8 Colorimetric Activity Assay Kit) belirtilen yöntem ile ölçüldü. Peptid substrat Ac-IETD-pNA kaspaz-8 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan pNA nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-8 aktivitesi hesaplandı.

Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi: Apoptoz esnasında mitokondri membran potansiyeli kaybı, JC-1 mitokondri membran potansiyeli belirleme kiti (MitoPT™ JC-1 Assay Kit, ImmunoChemistry) kullanılarak belirlendi. Sağlıklı hücrelerde JC-1 boyası mitokondride agregatlar şeklinde toplanır ve bu kırmızı floresan bir renk verir. Apoptotik hücrelerde ise mitokondri membran potansiyeli çökmüş olduğundan JC-1 boyası mitokondri içinde toplanamaz ve sitoplazmada monomerik formda kalarak yeşil floresan bir renk alır (Kulabaş ve ark., 2016).

Membran potansiyelinin belirlenmesi amacıyla hücreler $1x10^6$ hücre/ml olacak biçimde 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 24 saatlik inkübasyonun sonunda numuneler eklenerek inkübasyona bırakıldı (Beekman ve ark., 1997).

İnkübasyon süresinin sonunda pbs ile yıkanan kuyucuklardan tripsin-edta ile hücreler kaldırıldı ve 8000 rpm/5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine 1 ml 1X JC-1 solüsyonu eklenerek süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 37°C' de inkübatörde 15 dakika bekledikten sonra 8000 rpm/5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 2 tur olacak şekilde hücrelere 2 ml assay buffer eklenerek tekrar santrifüjlendi. Süpernatantın uzaklaştırılması ve hücrelerin uygun tampon çözelti ile süspanse edilmesi ile florospektrofotometre cihazında analizi gerçekleştirildi.

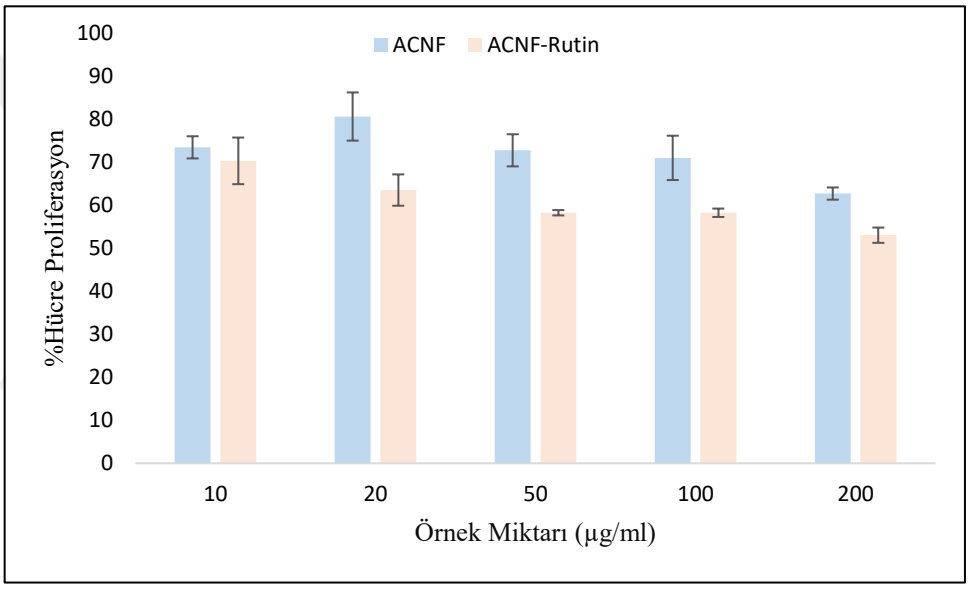
Akridin oranj ve etidyum bromür boyaları ile apoptozun saptanması: Akridin oranj ve etidyum bromür boyaları, canlı ve ölü hücreler ile nükleusta ve hücre membranındaki nekroz ve apoptoza bağlı değişiklikler hakkında bilgi vermektedirler. Akridin oranj, hem canlı hem ölü hücreleri boyarken, etidyum bromür sadece membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyar. Canlı hücreler morfolojik olarak üniform yeşil renkli boyanırlar. Apoptozun erken dönemindeki hücrelerde yeşil-sarı renkte boyanmakta ancak nükleuslarında, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmantasyonu gösteren parlak yeşil-sarı renkli noktalanmalar içermektedirler. Geç apoptotik dönemdeki hücreler karakteristik parçalanmış nükleus görünümler ile turuncunun değişik tonları şeklinde gözlenir. Etidyum bromür nekrotik hücrelerin çekirdeklerinin kırmızı renkte görünmesine neden olur.

Deneyin yapılışı: 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler 24 saat sonrasında nanolifler eklenerek inkübe edildi. Kuyucuklarda bulunan hücre besiyeri çıkarıldıktan sonra, PBS ile hücreler iyice yıkandı ve ardından metanol ile fikse edildiler. Fiksasyondan sonra kuyucuklara akridin oranj (100 mg/ml) ve etidyum bromür (100 mg/ml) içeren boya solüsyonu eklenerek 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Boyama işleminin ardından hücreler 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskop altında görüntülendi ve kaydedildi.

6. BULGULAR

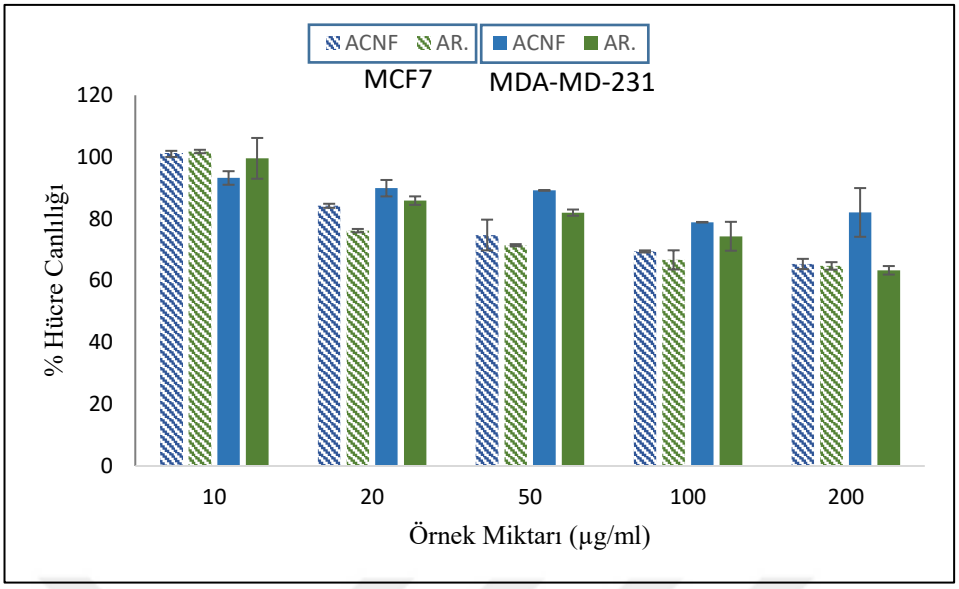
6.1. Hazırlanan Rutin ile Modifiye Edilmiş ACNF'in Hücre Proliferasyonuna Etkisi

CNF'in aktifleştirilmesi ile hazırlanan ACNF ve rutin ile modifiye edilmiş ACNF'in (AR), MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi incelenmeden önce sağlıklı hücre hattı olan NIH3T3 üzerindeki etkisine MTT yöntemi ile bakıldı (**Şekil 3**).



Şekil 3. ACNF ve Rutin ile modifiye edilmiş AR'nin NIH3T3 hücre canlılığına etkisi.

PBS ortamında hazırlanan örnekler, MTT protokolüne uygun bir şekilde NIH3T3 hücrelerine **Şekil 3**'de belirtilen konsantrasyonlarda eklendi. ACNF eklenen hücrelerin, 50 µg ve üstü miktarlarda kontrol gurubuna kıyasla %30-40 oranında inhibe olduğu belirlendi. Rutin ile modifiye edilen ACNF (AR) ise, tek başına ACNF uygulanan örneklere kıyasla doza bağlı olarak daha yüksek sitotoksik etki gösterdi. 10 µg AR uygulanan hücrelerin %29'u, 200 µg ise %46'sı inhibe oldu.



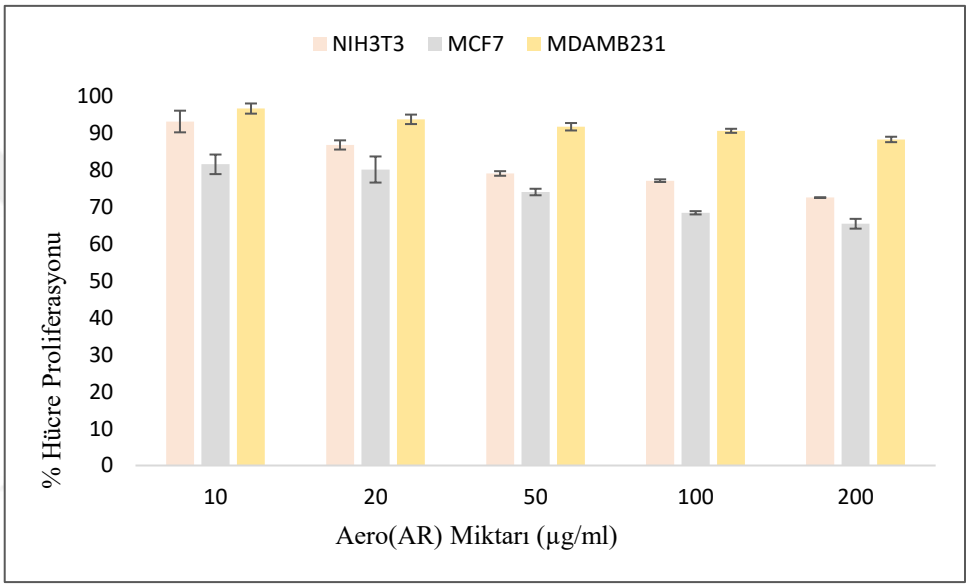
Şekil 4. ACNF ve Rutin ile modifiye edilmiş ACNF'in meme kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.

ACNF ve AR'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde ACNF'in rutin ile modifiye edilmesi sonucunda meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin doza bağlı olarak arttığı görülmektedir (**Şekil 4**).

Şekil 3'deki sonuçlar ile beraber AR, her üç hücre tipi üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. NIH3T3 hücreleri ile gerçekleştirilen % canlılık deneylerinin sonuçları değerlendirildiğinde sağlıklı hücreler üzerindeki biyouyumluluğu artırmak adına rutin ile modifiye edilmiş ACNF (AR) içeren sodyum aljinat aerojel ile çalışmalara devam edildi.

6.2. Rutin ile Modifiye Edilmiş ACNF İçerikli Aerojel Matrislerin Sağlıklı ve Meme Kanseri Hücrelerinin Canlılığına Etkisi

Rutin ile modifiye edilmiş ACNF (AR) içeren kompozit aerojellerin, Aero (AR), NIH3T3, MCF-7 ve MDA-MB-321 hücrelerindeki antiproliferatif etkinliğini belirlemek amacıyla MTT deneyleri yapıldı.



Şekil 5. Rutin ile modifiye edilmiş ACNF içeren aerojel kompozitlerin hücre proliferasyonuna etkisi.

Şekil 5 incelendiğinde Aero (AR) eklenen NIH3T3 hücrelerinde, doza bağlı olarak hücre sayısının azaldığı ancak hücreler için güvenli aralıklarda olduğu görülmektedir. En yüksek miktar olan 200 µg'da NIH3T3 hücrelerinin % 72'si canlılığını sürdürmektedir. Bu durumda Aero (AR) 10-200 µg örnek içeren doz aralıklarında NIH3T3 için sitotoksik etki göstermemektedir.

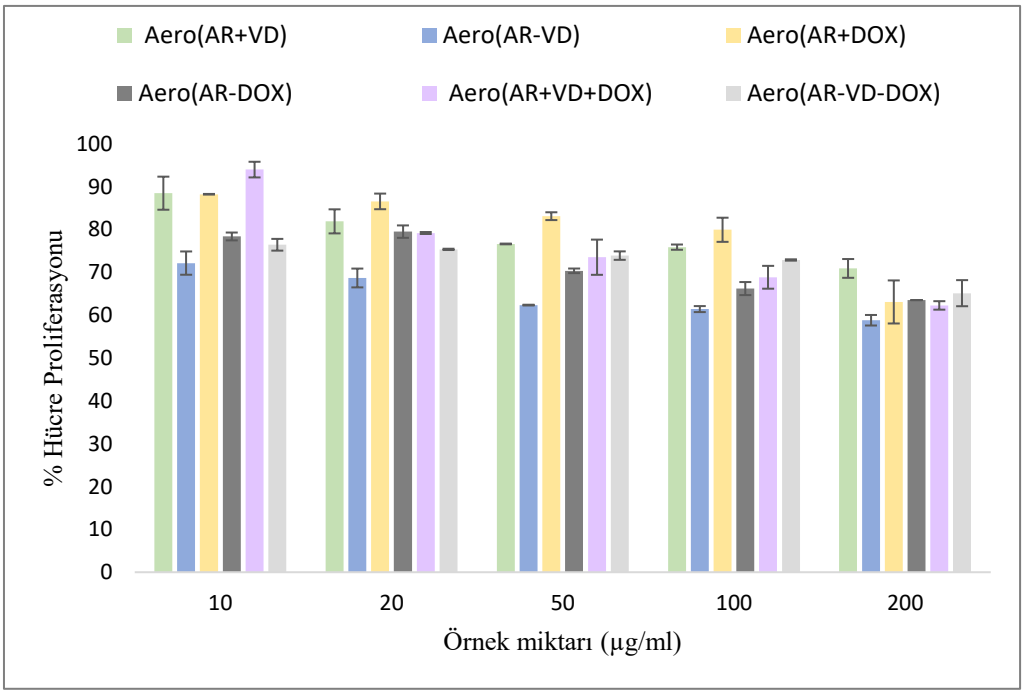
MCF-7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etki incelendiğinde, hücrelerin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir. 50 µg/ml uygulanan dozdan itibaren hücrelerin %30'dan fazlası inhibe olmaktadır. MDA-MD-231 hücre hattı için, kontrol grubuna göre ortalama %10'luk bir inhibisyon olması sebebiyle Aero (AR) bu meme kanseri alt tipi için sitotoksik etki göstermemektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda VD ve DOX içeren kompozit aerojellerin etkisini incelemek üzere MTT deneylerine devam edildi.

6.3. Rutin ile Modifiye edilmiş ACNF ile VD ve DOX İçeren Kompozit Aerojellerin Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Elde edilen veriler doğrultusunda VD ve DOX içeren aerojel taşıyıcı sistemler geliştirildi. Bu aşamada ilk olarak rutin ile modifiye edilmiş ACNF' e tek VD, tek DOX ve VD ile DOX olacak şekilde yüklendikten sonra kompozit aerojeller hazırlandı. Bu örnekler, Aero (AR-VD), Aero (AR-DOX), Aero (AR-VD-DOX) şeklinde isimlendirildi.

Bir diğer durumda ise, rutin ile modifiye edilmiş ACNF ile VD ve DOX, aerojel üretiminden hemen önce birbirlerine karıştırılarak aerojel kompozitler hazırlandı. Hazırlanan örnekler Aero (AR+VD), Aero (AR+DOX), Aero (AR+VD+DOX) şeklinde isimlendirildi.

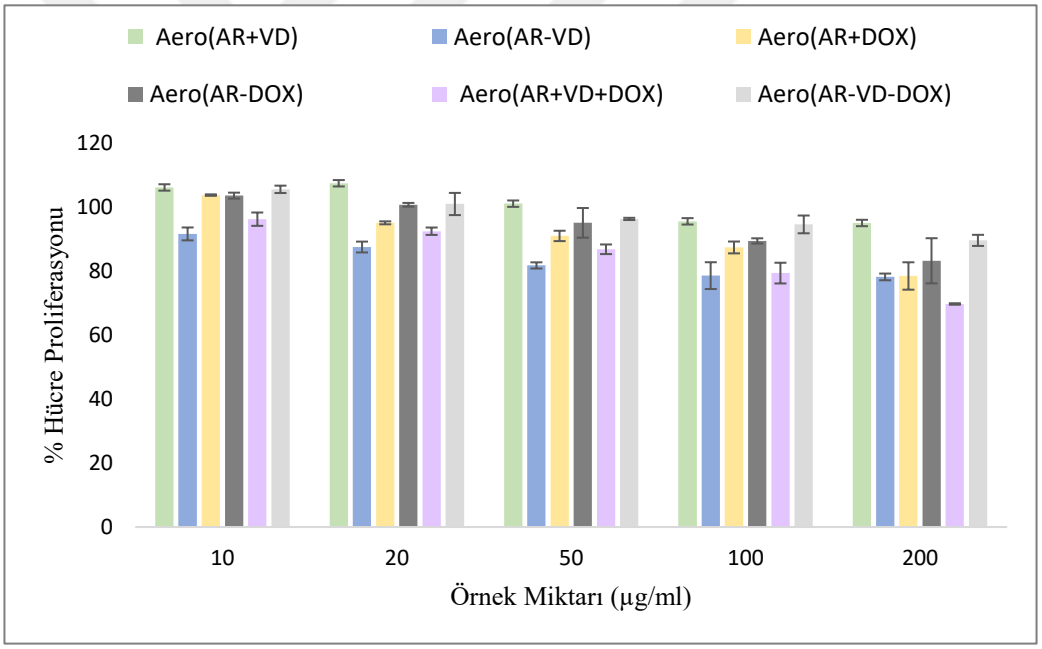


Şekil 6. Hazırlanan karbon bazlı nanosistemlerin MCF-7 proliferasyonuna etkisi.

MTT sonuçlarına göre (**Şekil 6**) Aero (AR-VD), Aero (AR+VD)' ye göre MCF-7 hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etki göstermektedir. Bu iki örnek incelendiğinde Aero (AR-VD) eklenen kuyucuklarda hücre sayısı doza bağlı olarak azalmaktadır ve 200 µg/ml derişimde hücrelerin % 42'si inhibe olmaktadır.

Aero (AR-DOX)'un ise Aero (AR+DOX)'a göre daha fazla hücre inhibisyonuna sebep olduğu görülmektedir. 200 µg/ml derişimde Aero (AR-DOX) eklenen MCF-7 hücrelerinin %36'sı inhibe olmaktadır.

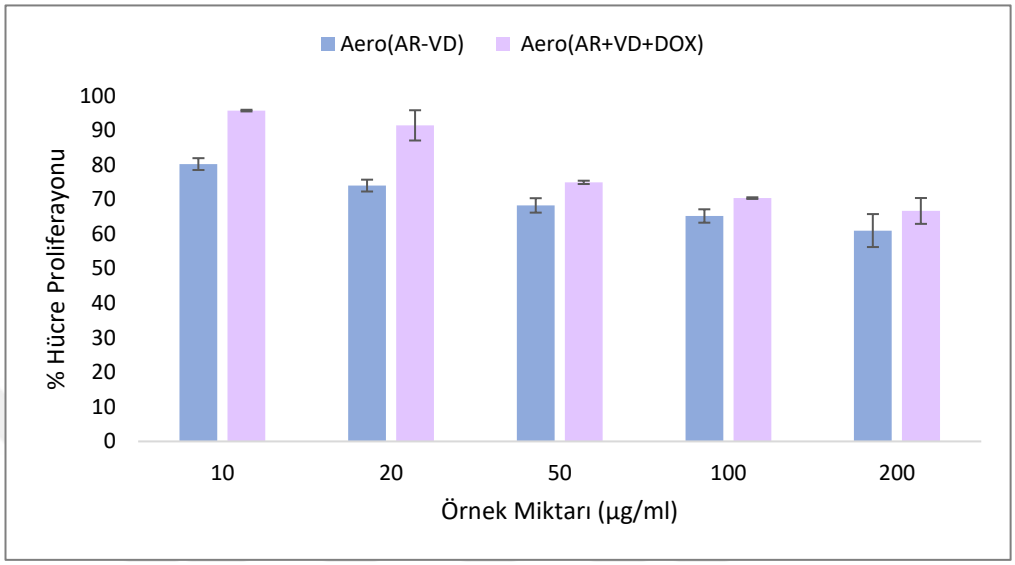
Aero (AR-VD-DOX) ve Aero (AR+VD+DOX) örnekleri birbirlerine yakın değerlerde sonuçlar vermekle beraber Aero (AR+VD+DOX) 50, 100 ve 200 µg/ml derişimlerde daha yüksek antiproliferatif etki göstermektedir. 200 µg/ml Aero (AR+VD+DOX) eklenen kuyucuklarda MCF-7 hücrelerinin %40'ı inhibe olmaktadır.



Şekil 7. Hazırlanan karbon bazlı nanosistemlerin MDA-MB-231 proliferasyonuna etkisi.

Hazırlanan örneklerin, MDA-MB-231 hücrelerindeki etkisi **Şekil 7**'de gösterilmektedir. En yüksek sitotoksik etki, %30 inhibisyon ile 200 µg/ml derişimdeki Aero (AR+VD+DOX) ile kaydedilmektedir. Bu doğrultuda, hazırlanan kompozit aerojel sistemlerin daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği MCF-7 hücre hattı ile deneylerin devamı sağlanmıştır.

MCF-7 hücre hattında en iyi sonuçların alındığı iki örnek olan Aero (AR-VD) ve Aero (AR+VD+DOX)'un, sağlıklı hücrelerdeki etkisini incelemek üzere MTT deneyleri gerçekleştirildi (**Şekil 8**).

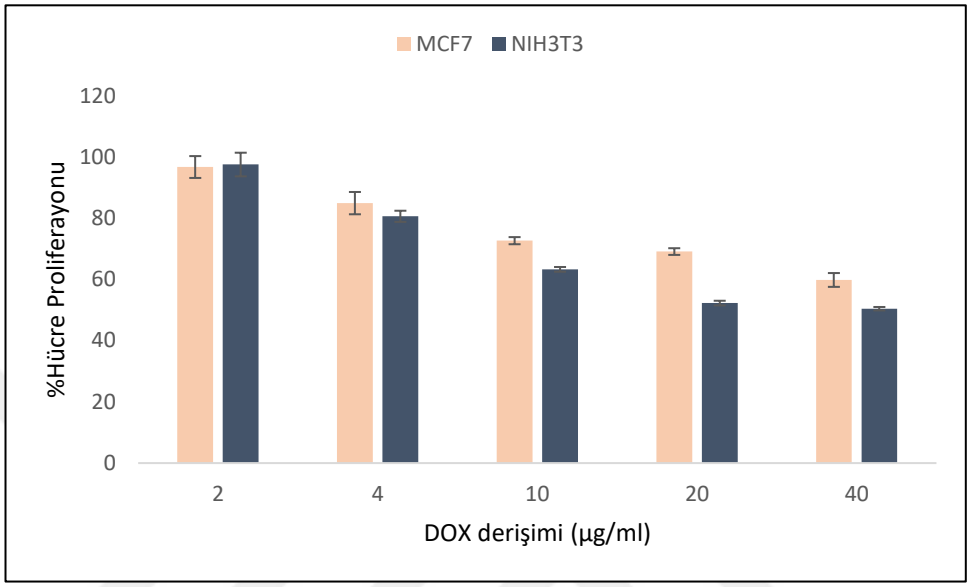


Şekil 8. Hazırlanan karbon bazlı nanosistemin NIH3T3 hücre canlılığına etkisi.

Şekil 8'de görüldüğü üzere, Aero (AR-VD) NIH3T3 hücrelerinde 20 µg/ml derişimden itibaren sitotoksik etki göstermektedir. Aero (AR+VD+DOX) ise uygulanan en yüksek derişime kadar güvenli aralıklarda kalmakta, 200 µg/ml derişimde hücrelerin %33'ünü inhibe etmektedir.

Gerçekleştirilen MTT deneyleri sonucunda, MCF-7 hücre hattı için 200 µg/ml'de %40 inhibisyon sağlayan ve NIH3T3 için güvenli aralıklarda sonuç veren Aero (AR+VD+DOX) ile çalışmalara devam edildi. Aero (AR+VD+DOX)'un MCF-7 hücrelerinde IC_{50} (Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon) değeri 272,5 µg/ml olarak hesaplandı.

DOX klinik ve preklinik olarak sıklıkla uygulanan bir kanser ilacıdır ve sağlıklı hücrelerdeki toksisitesi bilinmektedir. Geliştirilen kompozit aerojel taşıyıcı sistemin, DOX'un tek başına olan etkisine kıyasla nasıl bir değişim gösterdiği MCF-7 ve NIH3T3 hücreleri ile **Şekil 9**'da değerlendirildi.



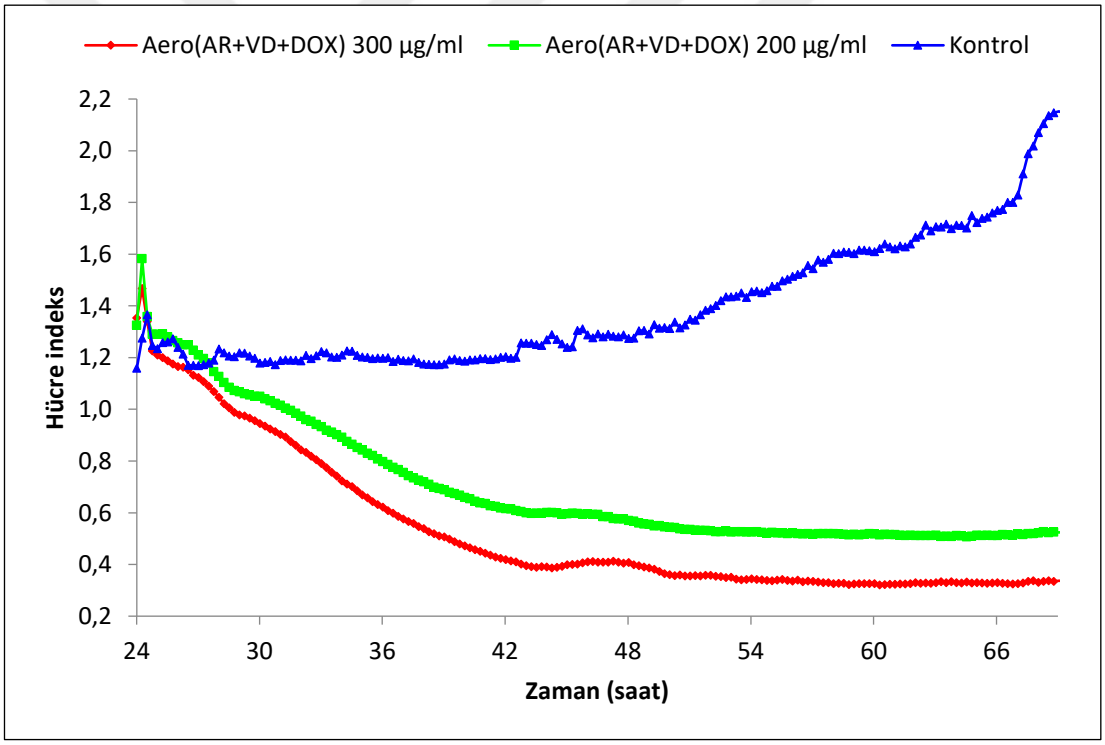
Şekil 9. DOX uygulanan MCF-7 ve NIH3T3 hücrelerinin canlılık oranları.

Aero (AR+VD+DOX)'un uygulandığı beş derişimin (10-20-50-100-200 µg/ml) içerdiği DOX miktarı hesaplanarak her iki hücreye tek başına eklendi. Elde edilen MTT sonuçlarına göre, iki hücre tipi için de DOX doza bağlı olarak sitotoksik etki göstermektedir. NIH3T3, MCF-7'ye kıyasla doza bağlı olarak daha fazla inhibe olmaktadır. 40 µg/ml derişimde tek başına DOX eklenen NIH3T3 hücrelerinin %50'si (**Şekil 9**), bu doza karşılık gelen 200 µg/ml Aero (AR+VD+DOX) eklenen NIH3T3 hücrelerinin %33'ü canlılığına devam edememektedir **(Şekil 8)**. Geliştirilen kompozit aerojel ilaç taşıyıcı sistem ile DOX'un NIH3T3 hücrelerindeki sitotoksik etkisinin azaltılması sağlandı.

6.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile Aerojel Kompozit Sistemin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan MTT analizleri sonucunda, MCF-7 ve NIH3T3 hücrelerindeki etkisi gösterilen Aero (AR+VD+DOX) ile gerçek zamanlı hücre analizi gerçekleştirildi. Bu sayede zamana bağlı olarak hücre canlılığının nasıl bir değişime uğradığı kaydedildi.

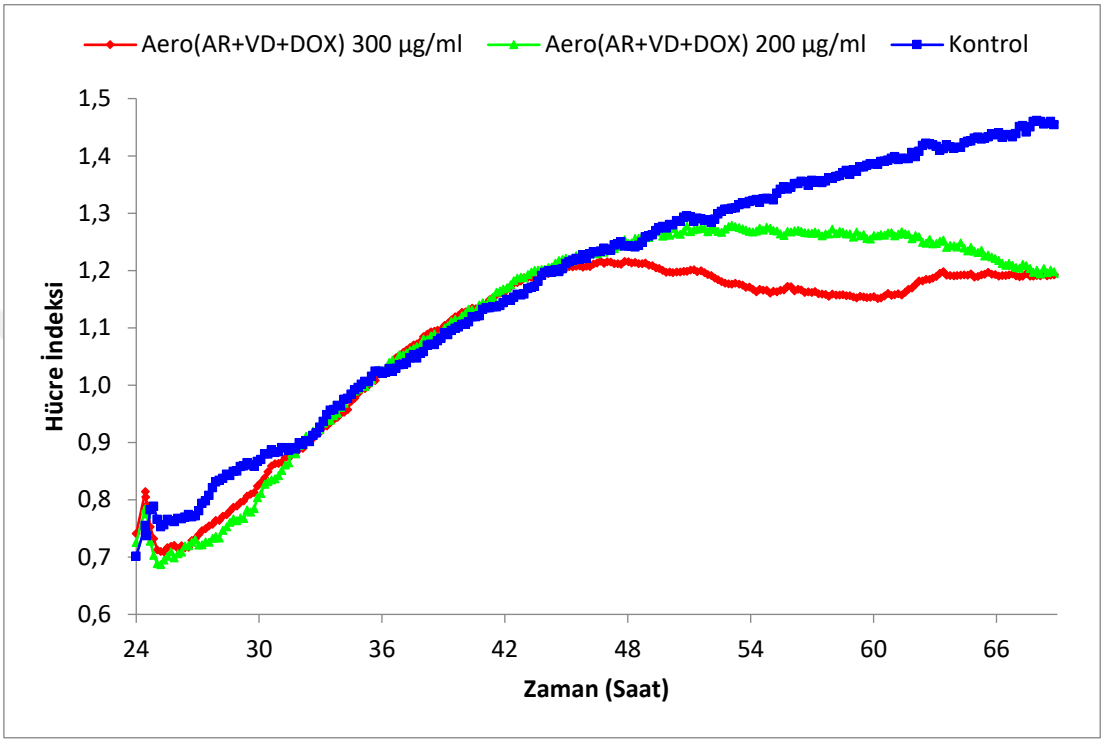
E-platelere eşit sayıda ekilen hücreler 24 saatin sonunda yeterli popülasyon çoğunluğuna ulaştı. Bu noktada, MTT analizlerine göre hesaplanan IC_{50} değeri dikkate alınarak 200 ve 300 µg/ml olmak üzere iki farklı dozda Aero (AR+VD+DOX) 24. saatte kuyucuklara eklendi.



Şekil 10. Aero (AR+VD+DOX)'un uygulanan MCF7 hücrelerinde zamana bağlı olarak hücre indeksi.

MCF-7 kontrol grubu sürecin sonuna kadar prolifere olmaya devam ederken bu süre zarfında hücre indeksi 1,2'den 2,2'ye kadar yükseldi.

200 ve 300 µg/ml Aero (AR+VD+DOX) eklenen kuyucuklarda MCF-7 hücre sayısı zamana bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Kontrol grubu 48. Saatte 1,5 hücre indeksine sahipken 200 ve 300 µg/ml eklenen örnek grupları sırası ile 0,6 ve 0,4'e geriledi (**Şekil 10**).



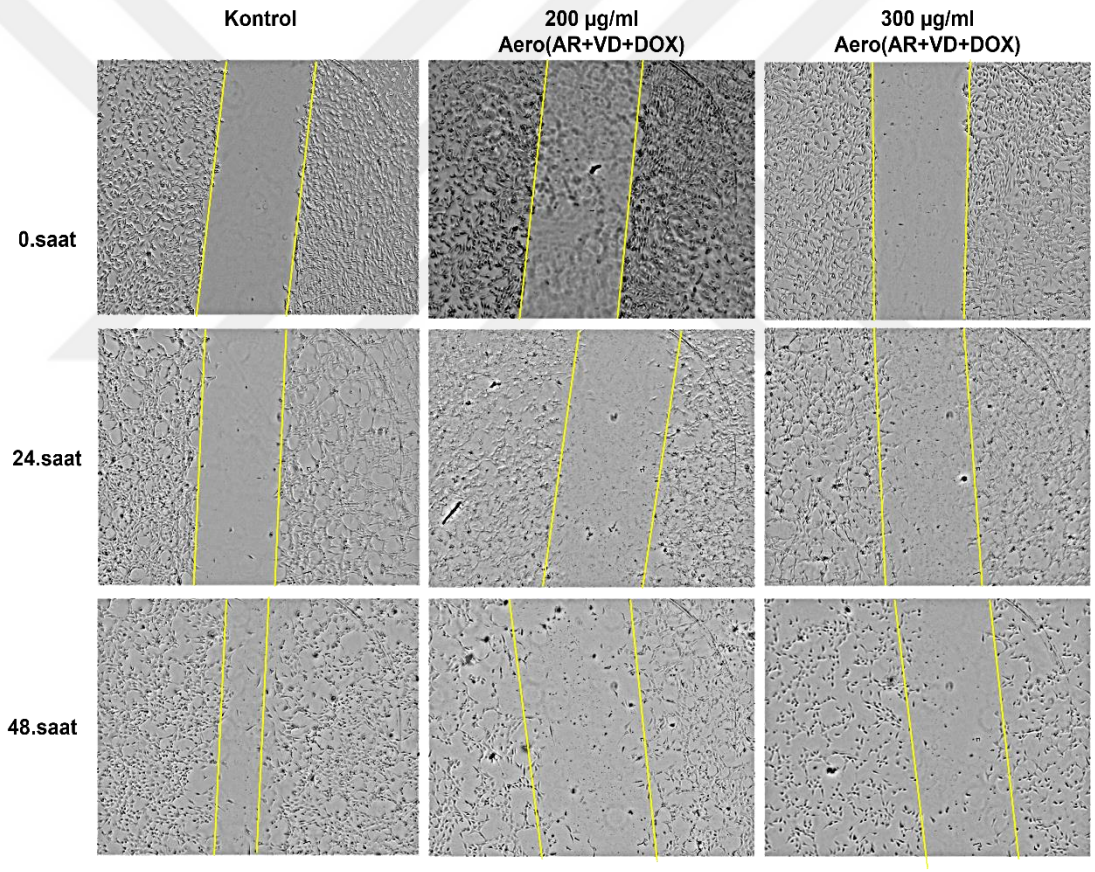
Şekil 11. Aero (AR+VD+DOX)'un uygulanan NIH3T3 hücrelerinde zamana bağlı olarak hücre indeksi.

Aero (AR+VD+DOX)'nin MCF7 ile aynı dozlarda NIH3T3 hücrelerine eklenmesi ile hücre indeksi değişimi kaydedildi (**Şekil 11**). 24.saatte örneğin eklenmesi ile birlikte kontrol ve örnek grubu hücreler 44. saate kadar proliferasyona devam etmektedir. 44. saatten itibaren hücre sayısı azalmaya başlamıştır ancak anlamlı bir inhibisyon kaydedilmemektedir.

MTT sonuçlarına paralel bir şekilde, Aero (AR+VD+DOX) MCF7 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı olarak antiproliferatif etki göstermektedir. NIH3T3 hücrelerinde ise sürecin sonunda örnek grubu hücreler %70 üzerinde canlılığını korumaktadır.

6.5. Kompozit Aerojel Taşıyıcı Sistemin MCF-7 Hücre Migrasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Yara açma analizi (wound healing assay), hücre göçünü ve hücre hücre etkileşimlerini incelemek için başvurulan tekniklerin başında gelmektedir. Bu teknik ile hücrelerin yoğun olduğu bölgeden açılan bir çizik, düzenli zaman aralıkları ile incelenmekte ve kaydedilmektedir. Kanser hücrelerinde çiziğin kapanma miktarı ve hızı, uygulanan maddenin hücre göçünü nasıl etkilediğini göstermektedir. Bu sayede invazif özellikler ve migrasyon hakkında bilgi sahibi olunmaktadır.



Resim 5. Aero (AR+VD+DOX) eklenen MCF7 hücrelerinin 48 saatteki yara kapanma değerlendirmesi.

Tablo 3. Aero (AR+VD+DOX) uygulanan MCF-7 hücrelerinde % yara kapanması.

	% Çizik Alanı		
	0.saat	**24.saat**	**48. saat**
Kontrol	24,17	23,15	11,57
200 µg/ml Aero (AR+VD+DOX)	26,79	26,89	27,53
300 µg/ml Aero (AR+VD+DOX)	25,045	23,444	24,995

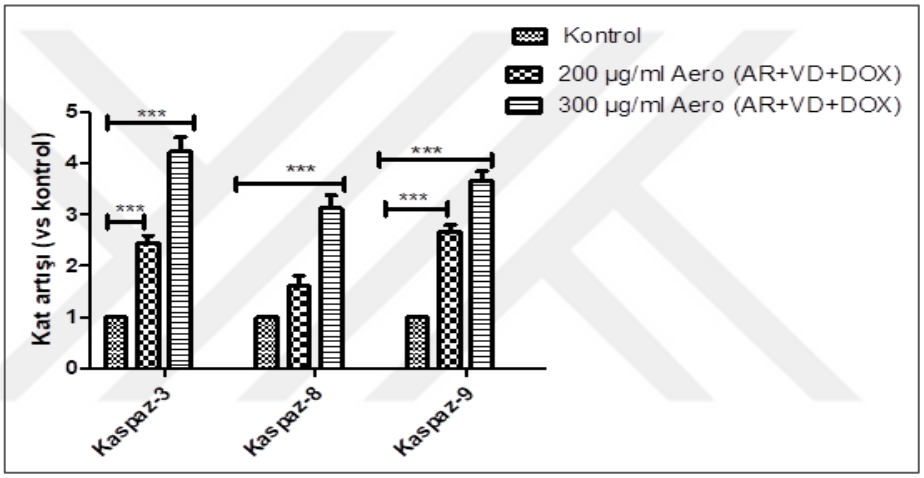
MCF-7 hücrelerine açılan çiziklerin Aero (AR+VD+DOX) eklendikten sonraki kapanma hızı 0, 24 ve 48. saatlerde kaydedildi (**Resim 5**). Elde edilen görüntülere göre, kontrol grubu çizik alanı 48. saatte yaklaşık olarak %50 kapanırken 200 ve 300 µg/ml Aero (AR+VD+DOX) eklenen kuyucukların çizik alanında istatistiksel olarak anlamlı bir kapanma gözlemlenmemektedir.

6.6. Hücre Ölüm Mekanizmalarının Biyokimyasal ve Morfolojik Olarak İncelenmesi

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, gelişim ve yaşlanma süreçlerinde, hücrelerin toksin maddeler veya hastalıklar tarafından hasar görmesi durumunda koruyucu olarak görev alan hemeostatik bir mekanizmadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve radyoterapi DNA hasarına yol açarak kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Hücre morfolojisindeki değişimler, nükleer DNA'nın parçalanması, kromatin yoğunlaşması, ve apoptotik cisimciklerin oluşumu apoptozla ilişkili belirteçlerdir (Kam, 2008).

6.6.1. Kaspaz 3-8-9 Enzim Aktivasyonu ile Apoptozun Saptanması

Hücrelerin, intrinsik (içsel, mitokondriyel) ya da ekstrinsik (dışsal, ölüm reseptörü) sinyaller ile uyarılmasının ardından apoptoz süreci başlamaktadır. Kaspazlar, proteaz sınıfı proteinlerdir ve apoptozu başlatıcı ile efektör olmak üzere iki sınıfı vardır. Kaspaz 8 ekstirinsik yolak üzerinden, kaspaz 9 ise intrinsik yolak üzerinden apoptozu başlatır. Her iki yolak, efektör kaspaz 3 üzerinden devam ederek hücreyi ölüme götürmektedir (Galluzi ark., 2018).



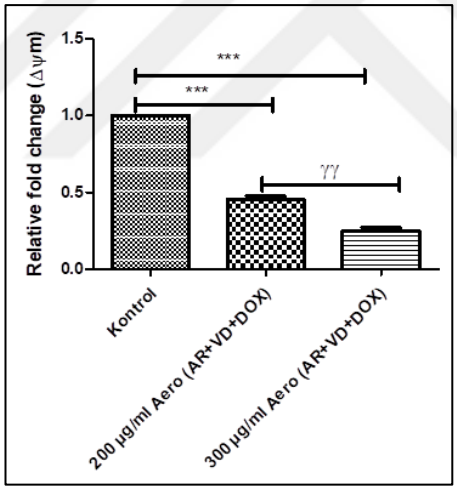
Şekil 12. Hazırlanan aerojel kompozit ilaç taşıyıcı sistemin MCF-7 hücrelerini apoptotik olarak uyarması (***p<0,001 kontrole göre).

Aero (R+VD+DOX)'un MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, ticari olarak satın alınan Kaspaz 3-8-9 enzim aktivitesi kitleriyle belirlendi. **Şekil 12'**deki grafiğe göre, hazırlanan aerojel kompozit ilaç taşıyıcı sistem içsel (kaspaz 9) ve dışsal sinyallerin her ikisiyle beraber apoptozu başlatmaktadır. Doza bağlı olarak kaspaz enzimlerinin aktivitesinin arttığı görülmektedir. Kaspaz 9 aktivitesi, kaspaz 8'e kıyasla daha yüksektir. Bu durum apoptozun daha çok mitokondriyel yolak ile başladığını göstermektedir. En yüksek aktivasyon değeri Kaspaz 3'de görülmektedir.

6.6.2. Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

Erken apoptoz sürecindeki hücrelerde, mitokondri membran potansiyelinde değişiklikler meydana gelmektedir. Mitokondri membran potansiyeli değişimi, iyonların ve küçük moleküllerin sitozole geçisine izin veren gözeneklerin açılmasını sağlamaktadır.

Mitokondri membran potansiyelinin saptanması amacıyla kullanılan problar pozitif yüke sahiptir ve mitokondrinin elektronegatif iç kısmında birikmelere sebep olur. Oluşan agregatlar, parlak kırmızı floresan sinyaller verir. Apoptotik süreçteki hücrelerin mitokondrilerinde membran potansiyeli düştüğünden dolayı prob monomer şeklinde kalır ve agregat oluşmaz. Bu durumda yeşil sinyaller vermektedir. Ölçüm değerlerine göre kırmızı/yeşil sinyal oranı hücrenin membran potansiyelinin nasıl değiştiğini belirtmektedir.



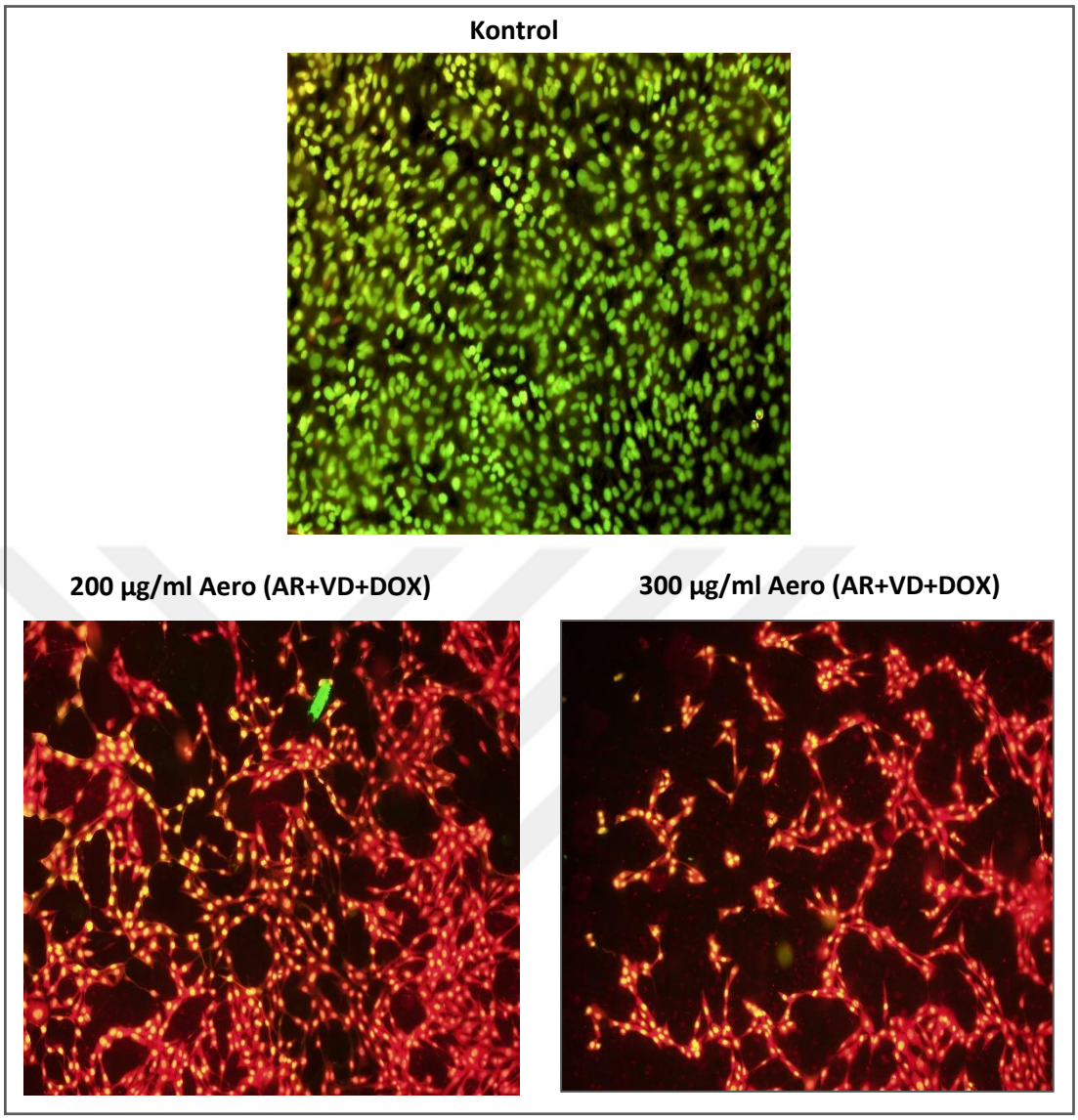
Şekil 13. Aero (AR+VD+DOX) eklenen MCF-7 hücrelerinde membran potansiyeli değişimi ***p<0,001 kontrole göre, Γp<0,01 300 µg/ml Aero (AR+VD+DOX).

Aero (AR+VD+DOX) eklenmiş MCF-7 hücrelerinde membran potasiyelindeki değişim JC-1 kiti kullanılarak florometrik yöntem ile incelendi. **Şekil 14**'deki sonuçlara göre, kontrol grubu hücrelere kıyasla Aero (AR+VD+DOX) uygulanan hücrelerin doza bağlı olarak membran potansiyelinin azaldığı görülmektedir.

Kaspaz enzim aktivasyonu ölçümlerinde, mitokondriyel yolakda rol alan kaspaz 9'daki artış ve mitokondri membran potansiyelinin azalması ile birbirleriyle paralel sonuçlar elde edilmektedir.

6.6.3. Akridin Oranj ve Etidyum Bromür Boyaları ile Apoptozun Saptanması

Aero (AR+VD+DOX) kompozit aerojel taşıyıcı sisteminin, meme kanseri hücre hattı MCF7 üzerindeki antiproliferatif etkisi gösterildikten sonra uygulanan biyokimyasal yöntemler ile apoptozu tetiklediği tespit edildi. Bu bilgiler doğrultusunda apoptozun morfolojik olarak gösterilmesi amacıyla akridin oranj (AO)-etidyum bromür (EtBr) boyaları ile inceleme yapıldı.



Resim 6. Aero (AR+VD+DOX) kompozit taşıyıcının MCF7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin akridin oranj-etidyum bromür boyaları ile gösterilmesi.

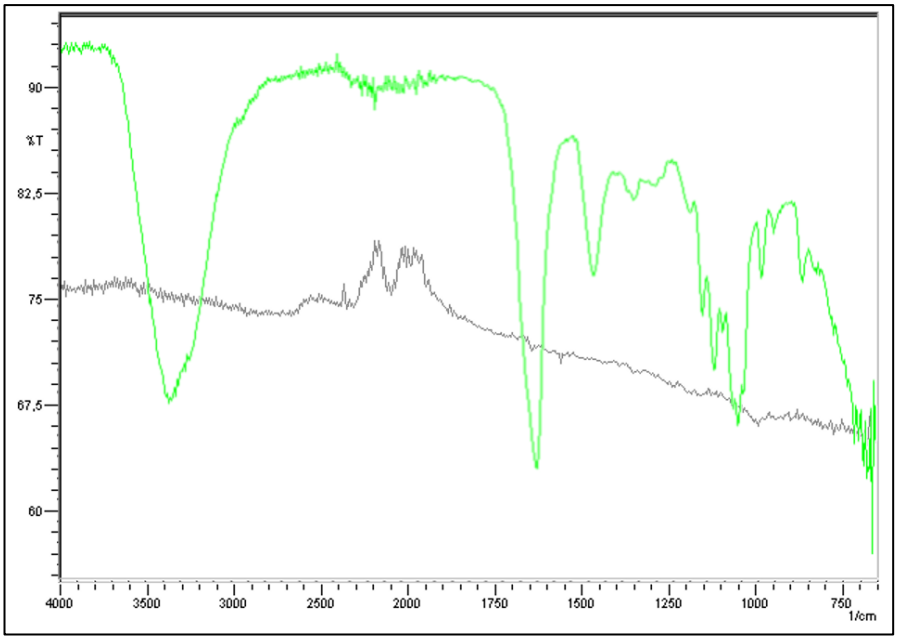
Ao-EtBr ile boyanan MCF7 hücreleri **Resim 6**'da görülmektedir. Kontrol grubunun floresan ışık altında yeşil renkte boyanması hücrelerin canlı olduklarını ve apoptoza girmediklerini göstermektedir. 200 ve 300 µg/ml Aero (AR+VD+DOX) eklenen örnek grubunda ise hücrelerin turuncu sarı arası renk almasıyla geç apoptotik süreçte oldukları anlaşılmaktadır. Ek olarak, hücre sayısının doza bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla azaldığı farktedilmektedir.

6.7. Rutin ile Modifiye Edilmiş ACNF ve Hazırlanan Kompozit Aerojel Taşıyıcı Sistemin Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında, VD ve DOX yüklü Rutin ile modifiye edilmiş ACNF içeren kompozit aerojel ilaç taşıyıcı sistem (Aero (AR+VD+DOX)) geliştirildi. Hazırlanan sistemin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre serileri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri araştırıldı.

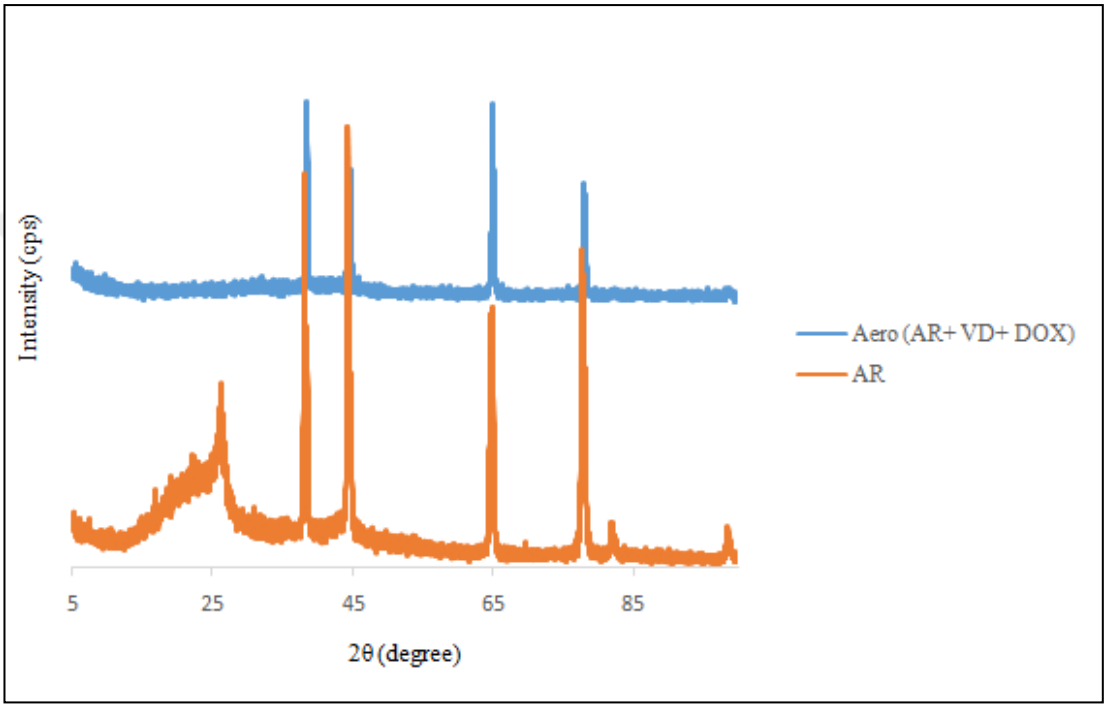
Karbon nanoliflerin ve geliştirilen kompozit aerojel taşıyıcı sistemin FTIR (**Şekil 14**) ve XRD analizleri yapıldı (**Şekil 15**).

Rutin ile modifiye edilmiş CNF ve kompozit aerojelin FTIR spektrumları **Şekil 14**'de verilmiştir. Kompozit aerojele ait spektrumdaki 3350 cm^{-1} civarında aljinat iskeletin O-H bağlarını gösteren gerilme bandı bulunmaktadır. Ayrıca 1625 cm^{-1} civarındaki keskin pik C=O, 1450 cm^{-1} ve 1350 cm^{-1} ile 1000 cm^{-1} arasndaki pikler C-C ve C-O tekli bağlarına karşılık gelir (Atieh, 2011; Kiani ve ark., 2017; Aprilliza ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017; Demirhan ve ark., 2021)



Şekil 14. Rutin İle modifiye edilmiş karbon nanolif ve aerojel kompozit taşıyıcı sistemin FTIR spektrumu (Yeşil- Aero (AR+VD+DOX) ve gri - AR) .

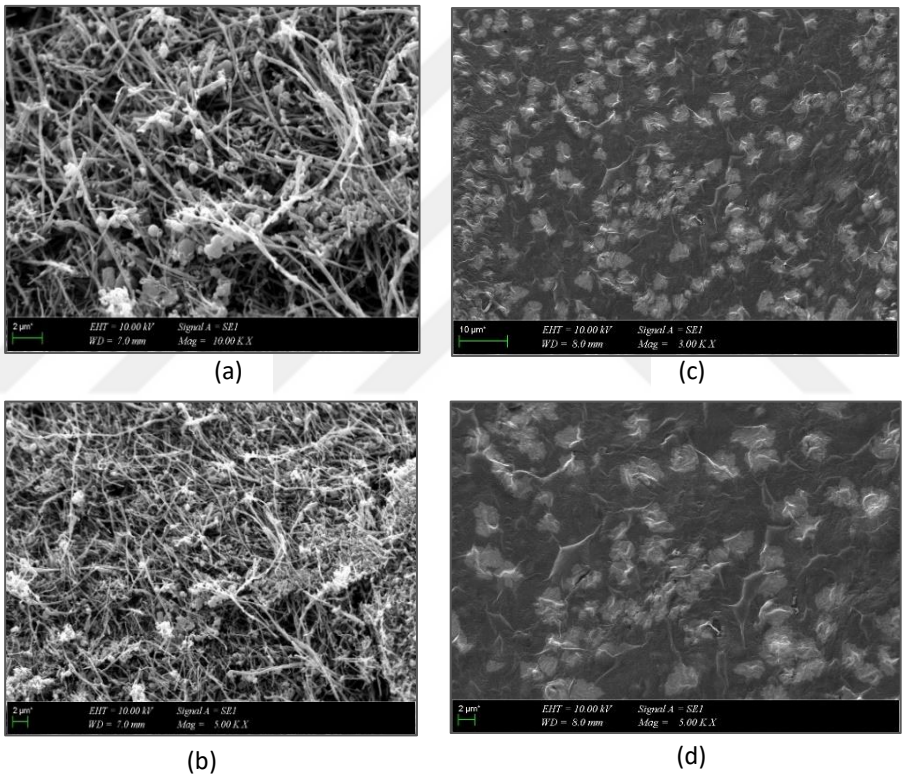
Rutin ile modifiye edilmiş ACNF, kompozit aerojel örneklerinin X-Işını kırınım desenleri kaydedilmiş ve **Şekil 15**'de gösterilmiştir. Karbon nanoliflerin karakteristik tepe noktaları, Rutin-ACNF'nin XRD spektrumunda görülmektedir. (002) düzlemini ifade eden ve karbonun amorf yapısını gösteren karakteristik pik yaklaşık 2θ=26 derecede görülmektedir. Ayrıca, tepe noktaları 2θ=44, 64 ve 77 değerlerinde karbon nanoliflere ait pikler de görülmektedir.



Şekil 15. Rutin İle modifiye edilmiş karbon nanolif ve aerojel kompozit taşıyıcı sistemin XRD analizi.

Yaklaşık 2θ=44'de önceki çalışmalara da uygun olarak görülen pik grafit yapının (100) düzlemine karşılık gelir. Kompozit aerojeli oluşturmak için aljinat matriks ile kombinasyondan sonra aerojel örneğinin XRD diyagramında yapıdaki değişim açıkça görülmektedir. Aljinat içeren kompozitlerin kırınım spektrumu, önceki çalışmalara da uygun olarak aljinat matriksinin amorf yapısını gösterir. Kompozit aerojellerde kristal yapı azalmıştır ve piklerde görülen değişiklikler, aljinat tarafından indüklenen kristal bileşimin değişimini gösterir (Rajeh ve ark., 2015; Shaari ve ark., 2020; Prasetyaningrum ve ark., 2021; Cong ve ark., 2021; Salihi ve Tulay, 2022)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak karbon nanolif ve üretilen aerojelin yapısı ve yüzey morfolojisi görüntülendi (**Resim 7**) SEM, nanolif ve aerojel örneklerinin yüzey morfolojisini ve yapısını analiz etmek için kullanıldı. Nanoliflerin lifli yapısı, boyutları ve şekli her iki SEM görüntüsünde de açıkça görülmektedir (**Resim 7a-b.**). Nanolifler yaklaşık olarak 100nm x 20–200µm boyutlarındadır. **Resim 7c-d.**'de görülen kompozit aerojelde ise nanolifler aljinat matriksinin içinde bulunmaktadır. Üretilen aerojelin gözenekli ve üniform olmayan yapısı SEM fotoğraflarında görülmektedir.



Resim 7. Rutin ile modifiye edilmiş ACNF (a,b) ve Aero (AR+VD+DOX)'un (c,d) SEM görüntüleri.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanserin tedavisine yönelik en yaygın kullanılan yöntemlerin başında kemoterapi uygulamaları gelmektedir ancak mevcut kemoterapi ilaçlarına karşı gelişen direnç ve gösterdikleri düşük seçicilik sebebiyle sağlıklı dokular üzerinde de toksisite görülmesi bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu durum araştırmacıları yeni ve potansiyel tedavi protokollerinin geliştirilmesine yöneltmektedir.

Güncel çalışmalar, karbon bazlı nanomalzemelerin antitümör ajanlar olarak hareket edebildiğini ve mevcut tedaviler ile birleştirildiğinde etkinliklerinin arttığını göstermektedir (Ringel ve ark., 2014; Garriga ve ark., 2020). Shao ve ekibinin geliştirdiği karbon nanotüp bazlı paklitaksel formülasyonunun, MCF-7 hücreleri üzerinde serbest ilaca göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Shao ve ark., 2013). Paklitaksel yüklü polietilen glikol-grafen oksit taşıyıcı kullanılan bir başka çalışmada, MCF-7 ve A549 hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak serbest ilaca kıyasla daha yüksek sitotoksik etki belirlenmiştir (Xu ve ark., 2015). Gerçekleştrilen tez çalışmasında sadece aktive edilmiş karbon nanolifler (ACNF) ile MCF-7 hücrelerinin %35'i (200µg/ml) inhibe olarak, MCF-7 için tek başına sitotoksik etki göstermektedir. Literatürde karbon nanotüplerin ve grafen nanomalzemelerin kansere karşı antikanser ilaçlar ile beraber kullanıldığı birçok çalışmaya denk gelinirken karbon nanolifler için mevcut çalışma sayısı sınırlı olduğu belirlenmiştir.

Karbon nanolifler, artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisine sahiptir (Stout, 2015). Bu etki, bir nanomalzemenin kanser dokularında normal dokulara kıyasla daha fazla birikebilme özelliğini ifade etmektedir (Dağlıoğlu, 2018). Aynı zamanda karbon nanolifler yapı ve boyutları gereği kolayca fonksiyonelleştirilebilen karbon bazlı nanomalzemelerdir. Küçük gruplar veya polimerler ile kimyasal veya fiziksel metodlar kullanılarak yüzeylerinin modifiye edilmesiyle, yüzey özellikleri, dağılım kalibiyetleri, biyouyumluluk seviyeleri, ilaç yükleme kapasiteleri değiştirilebilmekte ve çalışmanın amacına uygun hale getirilebilmektedir (Khan ve Alamry, 2022).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında ACNF, antioksidan kapasitesi yüksek rutin flavonoid bileşiği ile modifiye edildi. Bu etkileşim sonucu ACNF'in meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MD-231 üzerindeki sitotoksik etkisini arttırdığı kaydedildi. Sağlıklı hücreler üzerinde de bu etkinin artması sebebiyle çalışmanın devamında sodyum alijinat aerojeller ile ACNF-rutin birleştirilerek devam edildi. Bu sayede NIH3T3 için biyouyumlu bir taşıyıcı sistem oluşturulurken meme kanseri üzerindeki toksik etki de korunmuş oldu.

Rutinin tercih edilmesinde, antitümör aktivitesinin gösterildiği birçok çalışmanın mevcut olması dikkate alınmıştır. Bu çalışmalarda rutinin, NF-κB, TNF-α, interlökinler, LC3, Bcl-2 dahil olmak üzere çeşitli enflamatuar, apoptotik, otofajik ve anjiyojenik sinyal aracılarını hedeflediği gösterilmiştir (Satari ve ark., 2021). Elsayed ve ark., triple negatif meme hücreleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada, rutinin kanser ilerleyişi ve sağ kalımı için önemli bir sinyal yolağı olan c-MET fosforilasyonunu inhibe ettiğini; migrasyonun azaldığını ve antiproliferatif etki gözlemlendiğini rapor etmektedir (Elsayed ve ark., 2017). Ek olarak, literatürdeki hayvan modeli çalışmaları antioksidan özellikleri sayesinde rutinin kemokoruyucu özellik taşıdığını bildirmektedir (Yang ve ark., 2000).

Antrasiklin türevi kanser ilacı olan DOX, birçok kanser için klinikte sıklıkla kullanılmaktadır. DOX, kısa ömürlüdür ve arzu edilen etkinin sağlanabilmesi için yüksek dozda uygulanması gerekmektedir. Bu durum sağlıklı dokularda miyelosupresyona ve kardiyotoksisiteye neden olmaktadır (Shafei ve ark., 2017). Literatür taramaları göstermektedir ki DOX yüklü nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmalarda, meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser çeşidinde yan etkilerin azalması, ilaç sitotoksisitesinin artması ve çoğu durumda sitotoksik etki için gereken doz miktarının azaltılması sağlanmıştır. Ancak, geliştirilen formülasyonlara karşı sıklıkla direnç kazanılması, sağlıklı hücreler üzerinde DOX yüklü nanoformülasyonların istenilen seviyelerde biyouyumluluk gösterememesi, bu nanomalzemelerin çoğunun kararlı yapısını zaman içerinde koruyamaması ve dağılım özelliklerinin zayıf olması DOX için yeni platformları geliştirmeyi beraberinde getirmektedir.

İncelenen bir çalışmada, DOX yüklü hiyaluronik asit ile modifiye edilmiş grafen oksit nanotaşıyıcılar, CD44 reseptörü ve integrin kaynaklı endositoz yoluyla over kanseri hücrelerinde daha yüksek sitotoksisite göstermiştir (Guo ve ark., 2008). Benzer bir çalışmada, CD44'ün aşırı ifade edildiği MCF-7 hücrelerine uygulanan DOX yüklü hiyaluronik asit ile modifiye edilmiş grafen oksit nanotaşıyıcılar, sağlıklı hücreler üzerindeki biyouyumluluk korunurken kanser hücrelerini öldürmüştür (Pramanik ve ark., 2019). DOX'un karbon nanomalzemelere yüklendiği birçok çalışma mevcuttur ancak DOX yüklü karbon nanoliflerin meme kanseri üzerinde denendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Daha önce belirtildiği üzere DOX'un etki mekanizmalarından biri ROT'lar üzerinden gerçekleşmektedir. ACNF'in, serbest radikal bağlama kapasitesi yüksek Rutin ile modifiye edilmesi ve DOX'la birleştirildiği bu çalışmada, DOX'un sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Literatür verilerine göre, vitamin D'nin çeşitli kemoterapi ajanları ile beraber uygulandığı durumlarda ilaçların anti-kanser aktivitesini güçlendirdiğine dair önemli kanıtlar mevcuttur (Sundaram ve ark., 2003). Yapılan araştırmalarda VD ve kemoterapi ajanlarının sinerjistik etki gösterdiği birçok çalışmaya denk gelinmiştir. Zeicher ve ark. göre, Trastuzumab ile kemoterapi gören ve ayrıca VD takviyesi alan HER2 + meme kanseri hastalarda, aynı tedavide VD takviyesi almayanlara kıyasla, hastalıksız sağkalım açısından istatistiksel olarak önemli ölçüde iyileşme yaşanmıştır (Zeichner vd., 2015). *İn vivo* analizler, kalsitriolün kemoterapötik ajanlarla aynı anda veya öncesinde uygulandığında sinerjistik olarak etki ettiğini göstermektedir (Hershberger ve ark., 2003). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise kalsitriol ile zenginleştirilmiş DOX tedavisi sırasında, kalsitriolün VDR/PTPN2/p-STAT3 sinyallemesini düzenleyerek papiller tiroid kanseri hücrelerinin kemoterapi duyarlılığına katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2020). Lee ve ark., üçlü negatif meme kanseri fare modellerinde düşük VD takviyesi ile DOX etkinliğini azaltmadan, DOX tedavisi sırasında meydana gelen kardiyotoksik yan etkilerin azaldığını rapor etmiştir (Lee ve ark., 2021).

Çalışmamızda DOX içeren Rutin ile modifiye edilmiş ACNF'e VD_3 eklenerek hazırlanan aerojel kompozit, Aero (AR+VD+DOX), ile MCF7 hücreleri üzerinde

literatür verilerini destekler nitelikte sonuçlar elde edilirken MDA-MB-231 için istenilen sonuçlara ulaşılamadı.

MCF-7 üzerindeki inhibisyon etkisi Aero (AR) ve Aero (AR+DOX) için ortalama olarak %35 iken Aero (AR+VD+DOX) ile %40'a yükselmesi sağlandı. Kompozit oluşturulurken düşük miktarlarda VD ve DOX eklenmesine rağmen bu etkinin sağlanabilmesi ile mevcut klinikte kullanılan dozların tasarlanan taşıyıcı sistem ile azaltılabileceği gösterildi. Ek olarak, NIH3T3 hücreleri üzerinde tek başına %50 inhibisyona sebep olan DOX, aynı miktarda DOX içeren Aero (AR+VD+DOX) ile %33,3 inhibisyon gösterdi. Böylelikle DOX uygulaması için sağlıklı hücreler üzerindeki biyouyumluluk artması sağlandı.

Aero (AR+VD+DOX) uygulanan MCF-7 hücrelerinde yürütülen yara açma deneyleri, hücre göçünün kontrol grubuna göre inhibe olduğunu gösterdi. Hücre ölüm mekanizmalarının aydınlatılması amacı ile gerçekleştirilen kaspaz enzim aktivasyonu deneylerinde kaspaz 3-8-9'daki artış, hücrelerin hem intrinsik hem ekstrinsik yolak üzerinden apoptoza uğradığını ortaya koydu.

Rutin ile modifiye edilmiş ACNF'in VD ve DOX ile sodyum aljinat aerojel taşıyıcılar şeklinde hazırlanmasının MCF7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkinliğinin kanıtlandığı bu tez çalışması ile kanser tedavisine yönelik etkili, ekonomik, çevreci bir anlayışla üretilen ve sağlıklı dokular için biyouyumluluğu yüksek bir ilaç taşıma sistemi tasarlanmıştır.

Buradan elde edilen sonuçlar, ileride yapılacak CNF taban ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi açısından önem taşımakla birlikte diğer kanser tipleri dahil olmak üzere kalp damar rahatsizlıkları, diyabet, nörolojik bozukluklar, solunum yolu rahatsızlıkları gibi kronik hastalıkların tedavisi için de umut vadetmektedir.

8. KAYNAKLAR

Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW, vd. Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. Nanoscale Res Lett. 2014;9(1):1–10.

aerogel. In: The IUPAC Compendium of Chemical Terminology. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); 2008.

Ahmad V, Ahmad A, Khan SA, Ahmad A, Abuzinadah MF, Karim S, vd. Biomedical applications of aerogel. Adv Aerogel Compos Environ Remediat. 2021;33–48.

Almouazen E, Bourgeois S, Jordheim LP, Fessi H, Briançon S. Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: Formulation study and in vitro evaluation. Pharm Res. 2013;30(4):1137–46.

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, vd. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius. Biotechnol Bioeng. 1969 11(6):1101–10.

Arico AS, Baglio V, Antonucci V. Direct methanol fuel cells. Direct Methanol Fuel Cells. 2010;1–179.

Atieh, M. A. "Effect of Functionalized Carbon Nanofibers with Carboxylic Function Group on the Removal of Zinc from water", International Journal of Environmental Science and Development. 2011;142–145.

Azum N, Rub MA, Khan A, Parwaz Khan AA, Asiri AM. Aerogel applications and future aspects. Adv Aerogel Compos Environ Remediat. 2021;357–67.

Beekman AC, Barentsen ARW, Woerdenbag HJ, Van Uden W, Pras N, Konings AWT, vd. Stereochemistry-dependent cytotoxicity of some artemisinin derivatives. J Nat Prod. 1997;60(4):325–30.

Bikle DD. Extra Renal Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its Health Implications. Clin Rev Bone Miner Metab. 2009;7(2):114–25.

Blunt JW, Tanaka Y, DeLuca HF. Biological activity of 25-hydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D3. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968 ;61(4):1503–6.

Bouillon R, Manousaki D, Rosen C, Trajanoska K, Rivadeneira F, Richards JB. The health effects of vitamin D supplementation: evidence from human studies. Nat Rev Endocrinol. 2021;18(2):96–110.

Camarillo IG, Xiao F, Madhivanan S, Salameh T, Nichols M, Reece LM, vd. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. 2014;55–102.

Cao L, Liang Y, Zhao F, Zhao X, Chen Z. Chelerythrine and Fe3O4 Loaded Multi-Walled Carbon Nanotubes for Targeted Cancer Therapy. J Biomed Nanotechnol. 2016:1312–22.

Carbon-Based Nanomaterials. Introd to Nanosci Nanotechnol. 2008;189–236.

Cong, R., Choi, J. Y., Song, J. B., Jo, M., Lee, H. ve Lee, C. S. Characteristics and electrochemical performances of silicon/carbon nanofiber/graphene composite films as anode materials for binder-free lithium-ion batteries, Scientific reports. 2021; 11(1).

Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annu Rev Biochem. 2001;70:369–413.

Chen Y, Fan Z, Zhang Z, Niu W, Li C, Yang N, vd. Two-Dimensional Metal Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications. Chem Rev. 2018;118(13):6409–55.

Chévez-Barrios P, Eagle RC, Marback EF. Histopathologic features and prognostic factors. Clin Ophthalmic Oncol with CD-ROM. 2007;468–76.

Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. J Ethnopharmacol. 2013;150(3):805–17.

Cooper GM. The Development and Causes of Cancer. 2000

Dağlıoğlu C. İlaç Taşıma Sistemleri olarak Nanopartiküller kullanılarak Pasif ve Aktif Tümör Hedeflemelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi. Acad Platform-Journal Eng Sci. 2018;2017–29.

Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Ca an nc ce er r. J Cancer. 2017;8(16):3131–41.

Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JAP, Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. Arch Toxicol. 2016;90(9):2063–76.

Das S, Mukherjee A, Sengupta G, Singh VK. Overview of nanomaterials synthesis methods, characterization techniques and effect on seed germination. Nano-Materials as Photocatal Degrad Environ Pollut Challenges Possibilities. 2020;371–401.

Daştan H, Karbon Nanolif Taşıyıcılara Yüklenmiş D Vitamininin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması,Yüksel Lisans Tezi,2022, İstanbul (Danışman: Doç. Dr. B Özakpınar Ö)

Debnath SK, Srivastava R. Drug Delivery With Carbon-Based Nanomaterials as Versatile Nanocarriers: Progress and Prospects. Front Nanotechnol. 2021;3:15.

Demirhan, K., Bingol Ozakpinar, O. ve Salihi, E. C. Green and one step modification of graphene oxide using natural substances. 2021; 716–723.

Dervin S, Pillai SC. An Introduction to Sol-Gel Processing for Aerogels. 2017;1–22.

Dinour D, Beckerman P, Ganon L, Tordjman K, Eisenstein Z, Holtzman EJ. Loss-of-function mutations of CYP24A1, the vitamin D 24-hydroxylase gene, cause long-standing hypercalciuric nephrolithiasis and nephrocalcinosis. J Urol. 2013;190(2):552–7.

Dominguez LJ, Farruggia M, Veronese N, Barbagallo M. Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. Metabolites. 2021;11(4).

Dowd DR, MacDonald PN. Vitamin D Receptor. Encycl Biol Chem Second Ed. 2013;540–4.

Du A, Zhou B, Zhang Z, Shen J. A special material or a new state of matter: A review and reconsideration of the aerogel. Materials (Basel). 2013;6(3):941–68.

Elsayed HE, Ebrahim HY, Mohyeldin MM, Siddique AB, Kamal AM, Haggag EG, vd. Rutin as A Novel c-Met Inhibitory Lead for The Control of Triple Negative Breast Malignancies. Nutr Cancer. 2017;69(8):1256.

Endo M, Kim YA, Ezaka M, Osada K, Yanagisawa T, Hayashi T, vd. Selective and efficient impregnation of metal nanoparticles on cup-stacked-type carbon nanofibers. Nano Lett. 2003 ;3(6):723–6.

Endo M, Koyama T, Hishiyama Y. Structural improvement of carbon fibers prepared from benzene. Jpn J Appl Phys. 1976;15(11):2073–6.

Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. Cancer Treat Rev. 2012;38(6):698–707.

Feldman D, Krishnan A V., Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nat Rev Cancer. 2014 ;14(5):342–57.

Feng L, Xie N, Zhong J. Carbon Nanofibers and Their Composites: A Review of Synthesizing, Properties and Applications. Materials (Basel) 2014 [cited 2022 Dec 16];7(5):3919.

Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, vd. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes Dis. 2018;5(2):77.

Finegan IC, Tibbetts GG, Glasgow DG, Ting JM, Lake ML. Surface treatments for improving the mechanical properties of carbon nanofiber/thermoplastic composites. J Mater Sci. 2003;38(16):3485–90.

Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. Nat Rev Cancer. 2010

Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2018;27(1):95–120.

Fu B, Sun J, Cheng Y, Ouyang H, Compagnini G, Yin P, vd. Recent Progress on Metal-Based Nanomaterials: Fabrications, Optical Properties, and Applications in Ultrafast Photonics. Adv Funct Mater. 2021;31(49):2107363.

Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc. 2017;25(2):149–64.

Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc. 2017;25(2):149–64.

García-Quiroz J, García-Becerra R, Santos-Martínez N, Avila E, Larrea F, Díaz L. Calcitriol stimulates gene expression of cathelicidin antimicrobial peptide in breast cancer cells with different phenotype. J Biomed Sci. 2016;23(1):1–7.

Garriga R, Herrero-Continente T, Palos M, Cebolla VL, Osada J, Muñoz E, vd. Toxicity of Carbon Nanomaterials and Their Potential Application as Drug Delivery Systems: In Vitro Studies in Caco-2 and MCF-7 Cell Lines. Nanomate.r 2020, Vol 10, Page 1617 2020;10(8):1617.

Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol. 1999;57(7):727–41.

Ghanbari-Movahed M, Mondal A, Farzaei MH, Bishayee A. Quercetin- and rutin-based nano-formulations for cancer treatment: A systematic review of improved efficacy and molecular mechanisms. Phytomedicine. 2022;97.

Ghodake Sagar S. Londhe Babasaheb C. IRJET- A Review on Aerogel An Introduction. Int Res J Eng Technol. 2018;5(3).

Giammanco M, Di Majo D, La Guardia M, Aiello S, Crescimannno M, Flandina C, vd. Vitamin D in cancer chemoprevention. Pharm Biol. 2015;53(10):1399–434.

Gullón B, Lú-Chau TA, Moreira MT, Lema JM, Eibes G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability [Internet]. Trends Food Sci. Technol. 2017;67:220–35.

Guo Y, Shi D, Cho H, Dong Z, Kulkarni A, Pauletti GM, vd. In vivo Imaging and Drug Storage by Quantum-Dot-Conjugated Carbon Nanotubes. Adv Funct Mater 2008;18(17):2489–97.

Güneş Bayır A, Aksoy AN, Koçyiğit A. The Importance of Polyphenols as Functional Food in Health. Bezmialem Sci. 2019;7(2):157–63.

Haddad JG. Transport of vitamin D metabolites. Clin Orthop Relat Res. 1979 ;142(142):249–61.

Hanson FB, Tier C. A stochastic model of tumor growth. Math Biosci. 1982;61(1):73–100.

Hashemi SHB, Karimi S, Mahboobi H. Lifestyle changes for prevention of breast cancer. Electron Physician. 2014;6(3):894.

Helmiyati, Aprilliza, M., Helmiyati ve Aprilliza, M. Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent, MS&E. 2017; 188(1), 012019.

Hoepfner S, Ratke L, Milow B. Synthesis and characterisation of nanofibrillar cellulose aerogels. Cellulose. 2008;15(1):121–9.

Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am J Clin Nutr. 2008;87(4).

Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am J Clin Nutr. 2008 ;87(4).

Holick MF, Maclaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Anderson RR, vd. Photosynthesis of Previtamin D3 in Human Skin and the Physiologic Consequences. Science. 1980;210(4466):203–5.

Hosnedlova B, Kepinska M, Fernandez C, Peng Q, Ruttkay-Nedecky B, Milnerowicz H, vd. Carbon Nanomaterials for Targeted Cancer Therapy Drugs: A Critical Review. Chem Rec. 2019;19(2–3):502–22.

Houghton LA, Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. Am J Clin Nutr. 2006;84(4):694–7.

Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y La, Girard L, Gandhi J, vd. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. PLoS One. 2009;4(7).

Kato S. The function of vitamin D receptor in vitamin D action. J Biochem. 2000 ;127(5):717–22.

Kiani, A., Fathi, M. ve Ghasemi, S. M. (2017) Production of novel vitamin D3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification. 2017; 20(11), 2466–2476.

Khammissa RAG, Fourie J, Motswaledi MH, Ballyram R, Lemmer J, Feller L. The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. Biomed Res Int. 2018;2018.

Khan A, Alamry KA. Surface Modified Carbon Nanotubes: An Introduction. ACS Symp Ser. 2022;1–25.

Khan N, Adhami VM, Mukhtar H. Review: Green Tea Polyphenols in Chemoprevention of Prostate Cancer: Preclinical and Clinical Studies. Nutr Cancer. 2009;61(6):836.

Kimlin MG. Geographic location and vitamin D synthesis. Mol Aspects Med. 2008;29(6):453–61.

Koval'skii I V., Krasnyuk II, Krasnyuk II, Nikulina OI, Belyatskaya A V., Kharitonov YY, vd. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action: Mechanisms of rutin pharmacological action (review). Pharm Chem. 2014;48(2):73–6.

Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, vd. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. JAMA. 2017;317(23):2402–16.

Kumar N, Kumbhat S. Essentials in Nanoscience and Nanotechnology. Essentials Nanosci Nanotechnol. 2016;1–470.

Kumar S, Doshi H, Srinivasarao M, Park JO, Schiraldi DA. Fibers from polypropylene/nano carbon fiber composites. Polymer (Guildf). 2002;43(5):1701–3.

Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. Am J Clin Nutr. 2007 ;85(6):1586–91.

Lee KJ, Wright G, Bryant H, Wiggins LA, Dal Zotto VL, Schuler M, vd. Cytoprotective effect of vitamin d on doxorubicin-induced cardiac toxicity in triple negative breast cancer. Int J Mol Sci. 2021;22(14):7439.

Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. Nutrients. 2014;6:6020–47.

Liu Z, Fan AC, Rakhra K, Sherlock S, Goodwin A, Chen X, vd. Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for in vivo cancer therapy. Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(41):7668–72.

Luo G, Du L, Wang Y, Wang K. Composite Nanoparticles. Encycl Microfluid Nanofluidics. 2014;1–9.

Modification of drug release. Strateg to Modify Drug Release from Pharm Syst. 2015;15–28.

Mohamed A. Synthesis, Characterization, and Applications Carbon Nanofibers. Carbon-Based Nanofillers and Their Rubber Nanocomposites: Carbon Nano-Objects. 2019;243–57.

Mohammad A, Khan ME, Abutaleb A, Ali W, Tauqeer M, Yoon T, vd. Aerogel and its composites for sensing, adsorption, and photocatalysis. Adv Aerogel Compos Environ Remediat. 2021;125–44.

Moheman A, Bhawani SA, Tariq A. Aerogels for waterborne pollutants purification. Adv Aerogel Compos Environ Remediat. 2021;109–24.

Mostafa WZ, Hegazy RA. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. J Adv Res. 2015;6(6):793.

Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The "sunshine" vitamin. J Pharmacol Pharmacother. 2012;3(2):118–26.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, vd. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell. 2006;10(6):515–27.

Noman MT, Amor N, Ali A, Petrik S, Coufal R, Adach K, vd. Aerogels for Biomedical, Energy and Sensing Applications. Gels (Basel, Switzerland). 2021;7(4).

Odoux C, Fohrer H, Hoppo T, Guzik L, Stolz DB, Lewis DW, vd. A Stochastic Model for Cancer Stem Cell Origin in Metastatic Colon Cancer. Cancer Res. 2008 16;68(17):6932.

Org WE, Tian J, Wang D, Zheng Y, Jing T. ELECTROCHEMICAL SCIENCE A High Sensitive Electrochemical Avian Influenza Virus H7 Biosensor Based on CNTs/MoSx Aerogel. Int J Electrochem Sci. 2017;12:2658–68.

Pardo J, Peng Z, Leblanc RM. Cancer Targeting and Drug Delivery Using Carbon-Based Quantum Dots and Nanotubes. Mol A J Synth Chem Nat Prod Chem. 2018;23(2).

Patel KD, Singh RK, Kim HW. Carbon-based nanomaterials as an emerging platform for theranostics. Mater Horizons. 2019;6(3):434–69.

Perk AA, Shatynska-mytsyk I, Gerçek YC, Boztas K, Yazgan M, Fayyaz S, vd. Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells. Cancer Cell Int. 2014;14(1).

Posner GH, Crawford KR, Peleg S, Welsh J ellen, Romu S, Gewirtz DA, vd. A Non-Calcemic Sulfone Version of the Vitamin D 3 Analogue Seocalcitol (EB 1089): Chemical Synthesis , Biological Evaluation and Potency Enhancement of the Anticancer Drug Adriamycin. 2001;9:2365–71.

Pramanik N, Ranganathan S, Rao S, Suneet K, Jain S, Rangarajan A, vd. A Composite of Hyaluronic Acid-Modified Graphene Oxide and Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Magnetothermal Therapy. ACS Omega. 2019;4(5):9284–93.

Prasetyaningrum, A., Utomo, D. P., Raemas, A. F. A., Kusworo, T. D., Jos, B. ve Djaeni, M. Alginate/κ-Carrageenan-Based Edible Films Incorporated with Clove Essential Oil: Physico-Chemical Characterization and Antioxidant-Antimicrobial Activity, Polymers. 2021; Vol. 13, Page 354, 13(3), 354.

Rabišková M, Bautzová T, Gajdziok J, Dvořáčková K, Lamprecht A, Pellequer Y, vd. Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of inflammatory bowel disease: In vitro characteristics and in vivo evaluation. Int J Pharm. 2012;422(1–2):151–9.

Razak NA, Abu N, Ho WY, Zamberi NR, Tan SW, Alitheen NB, vd. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. Sci Reports. 2019;9(1):1–12.

Rajesh, R. ve Dominic Ravichandran, Y. Development of a new carbon nanotube-alginate-hydroxyapatite tricomponent composite scaffold for application in bone tissue engineering, International journal of nanomedicine. 2015; 10 Suppl 1(Suppl 1), 7–15.

Restivo J, Soares OSGP, Pereira MFR. Processing Methods Used in the Fabrication of Macrostructures Containing 1D Carbon Nanomaterials for Catalysis. Process. 2020;8(11):1329.

Riaz M, Tm Van Jaarsveld M, Hollestelle A, Prager-Van Der Smissen WJ, Aj Heine A, Boersma AW, vd. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. 2013

Ringel J, Erdmann K, Hampel S, Kraemer K, Maier D, Arlt M, vd. Carbon nanofibers and carbon nanotubes sensitize prostate and bladder cancer cells to platinum-based chemotherapeutics. J Biomed Nanotechnol. 2014;10(3):463–77.

Ruiz-Cornejo JC, Sebastián D, Lázaro MJ. Synthesis and applications of carbon nanofibers: A review. Rev Chem Eng. 2020;36(4):493–511.

Saleh TA, Gupta VK. Synthesis, Classification, and Properties of Nanomaterials. Nanomater Polym Membr. 2016;83–133.

Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, vd. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. Int J Mol Sci. 2013 ;14(10):21087.

Satari A, Ghasemi S, Habtemariam S, Asgharian S, Lorigooini Z. Rutin: A Flavonoid as an Effective Sensitizer for Anticancer Therapy; Insights into Multifaceted Mechanisms and Applicability for Combination Therapy. Evidence-based Complement Altern Med. 2021;2021.

Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S, Irwin A, Goos C, John U, vd. Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. N Engl J Med. 2011;365(5):410–21.

Schmedlen RH, Masters KS, West JL. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. Biomaterials. 2002;23(22):4325–32.

Sehaqui H, Zhou Q, Berglund LA. High-porosity aerogels of high specific surface area prepared from nanofibrillated cellulose (NFC). Compos Sci Technol. 2011;71(13):1593–9.

Serp P, Figueiredo JL. Carbon Materials for Catalysis. Carbon Mater Catal. 2008;1–579.

Shaari, N. ve Kamarudin, S. K. Sodium alginate/alumina composite biomembrane preparation and performance in DMFC application, Polymer Testing. 2020; 81, 106183.

Shafei A, El-Bakly W, Sobhy A, Wagdy O, Reda A, Aboelenin O, vd. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. Biomed Pharmacother. 2017;95:1209–18.

Shao W, Paul A, Zhao B, Lee C, Rodes L, Prakash S. Carbon nanotube lipid drug approach for targeted delivery of a chemotherapy drug in a human breast cancer xenograft animal model. Biomaterials. 2013;34(38):10109–19.

Sharma S, Sahni J, Ali J, Baboota S. Patent Perspective for Potential Antioxidant Compounds-Rutin and Quercetin. Recent Patents Nanomed. 2013;3(1):62–8.

Sizar O, Khare S, Goyal A, Givler A. Vitamin D Deficiency. Endocrinol Diabetes A Probl Approach. 2022;9781461486848:293–304.

Soorbaghi FP, Isanejad M, Salatin S, Ghorbani M, Jafari S, Derakhshankhah H. Bioaerogels: Synthesis approaches, cellular uptake, and the biomedical applications. Biomed Pharmacother. 2019;111:964–75.

Stout D. Recent Advancements in Carbon Nanofiber and Carbon Nanotube Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. Curr Pharm Des. 2015;21(15):2037–44.

Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. J Cancer Sci Ther. 2009;1(2):i–iv.

Sundaram S, Chaudhry M, Reardon D, Gupta M, Gewirtz DA. The vitamin D3 analog EB 1089 enhances the antiproliferative and apoptotic effects of adriamycin in MCF-7 breast tumor cells. Breast Cancer Res Treat. 2000;63(1):1–10.

Şenkarde S, B. Özakpınar Ö, Özsavcı D, Şener A, Çevik Ö, Güniz Küçükgüzel. Synthesis of Diflunisal Thiazolidinones as Anticancer Agents. Anticancer Agents Med Chem. 2016;16(10):1266–74.

Takeyama KI, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1α-Hydroxylase and Vitamin D Synthesis. Science. 1997;277(5333):1827–30.

Taymaz-Nikerel H, Karabekmez ME, Eraslan S, Kırdar B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. Sci Reports. 2018;8(1):1–14.

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, vd. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenet Genomic.s 2011;21(7):440.

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, Mcleod H, Klein TE, vd. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. 2010;

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, vd. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenet Genomics. 2011;21(7):440–6.

Tian C, Guo Y, Chang Y, Zhao J, Cui C, Liu M. Dose-effect relationship on anti-inflammatory activity on LPS induced RAW 264.7 cells and antioxidant activity of rutin in vitro. Acta Pol Pharm - Drug Res. 2019;76(3):511–22.

Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. Nutrients. 2010;2:1231–46.

Tsutsumi Y, Koga H, Qi ZD, Saito T, Isogai A. Nanofibrillar chitin aerogels as renewable base catalysts. Biomacromolecules. 2014;15(11):4314–9.

Wacker M, Holiack MF. Vitamin D—Effects on Skeletal and Extraskeletal Health and the Need for Supplementation. Nutrients. 2013;5(1):111.

Wang Y, Wang Y, Wan B, Han B, Cai G. Properties and Mechanisms of Self-Sensing Carbon Nanofibers/Epoxy Composites for Structural Health Monitoring. 2018;218.

Wang Z, Wu S, Wang J, Yu A, Wei G. Carbon Nanofiber-Based Functional Nanomaterials for Sensor Applications. Nanomaterials. 2019 ;9(7).

Wang Z, Wu S, Wang J, Yu A, Wei G. Carbon Nanofiber-Based Functional Nanomaterials for Sensor Applications. Nanomaterials. 2019;9(7).

Wang, J., Salihi, E. C. ve Šiller, L. Green reduction of graphene oxide using alanine", Materials Science and Engineering. 2017; C, 72, 1–6.

Webb AR, Decosta BR, Holick MF. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. J Clin Endocrinol Metab. 1989;68(5):882–7.

Welsh JE. Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. Anim Model Study Hum Dis. 2013;997–1018.

Wu AH. Cardiotoxic drugs: clinical monitoring and decision making. Heart. 2008;94(11):1503–9.

Xu Z, Zhu S, Wang M, Li Y, Shi P, Huang X. Delivery of paclitaxel using PEGylated graphene oxide as a nanocarrier. ACS Appl Mater Interfaces. 2015;7(2):1355–63.

Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, vd. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. Carcinogenesis. 2000;21(9):1655–60.

Yersal O, Barutca S. Ozlem Yersal, Sabri Barutca. World J Clin Oncol. 2014;5(3).

Yin W, Rubenstein DA. Biomedical Applications of Aerogels. Aerogels Handb. 2011;683–94.

Zaytseva O, Neumann G. Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications. Chem Biol Technol Agric. 2016;3(1):1–26.

Zhang T, He L, Wang Z, Dong W, Sun W, Qin Y, vd. Calcitriol enhances Doxorubicin-induced apoptosis in papillary thyroid carcinoma cells via regulating VDR/PTPN2/p-STAT3 pathway. J Cell Mol Med. 2020;24(10):5629–39.

Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. Sci Rep. 2017;7.

Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, Jones G, DeLuca HF. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(39):15650–5.